

Prüfung eines arteriellen In-vivo-
Thrombosemodells am Miniaturschwein
anhand von morphologischen und humoralen
Parametern und dessen Beeinflussung durch
eine neue thrombozytenfunktionshemmende
Substanz

Hans Wagner

1900

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 268177

Aus der Medizinischen Poliklinik der
Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. N. Zöllner

Prüfung eines arteriellen In-vivo-
Thrombosemodells am Miniaturschwein
anhand von morphologischen und humoralen
Parametern und dessen Beeinflussung durch
eine neue thrombozytenfunktionshemmende
Substanz

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans Wagner
aus
Iffeldorf
1980

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Priv.Doiz.Dr.med.M.Marshall

Mitberichterstatter : Prof.Dr.med.N.Zöllner

Dekan : Prof.Dr.med.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.5.1980



Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Einleitung</u>	1
2.	<u>Material und Methodik</u>	4
2.1	Vorbemerkungen.....	4
2.2	Versuchstiere.....	4
2.3	Versuchssubstanz.....	5
2.4	Versuchsablauf, Untersuchungsprogramm.....	6
2.5	Operationen, Blutentnahmen.....	15
2.6	Labor- und Untersuchungsmethoden.....	21
2.7	Statistik, Auswertung.....	26
3.	<u>Ergebnisse</u>	30
3.1	Versuchstiere.....	30
3.2	Serumkonzentrationen des Medikaments.....	32
3.3	Laboruntersuchungen.....	36
3.3.1	Klinisch-chemische Befunde.....	36
3.3.2	Hämorheologische Befunde.....	48
3.3.3	Plättchenteste.....	52
3.4	Subaquale Blutungszeit.....	57
3.5	Rasterelektronenmikroskopische Befunde....	57
4.	<u>Diskussion</u>	67
4.1	Arteriellcs Thrombosemodell.....	67
4.2	Prüfung der medikamentösen Beeinflußbarkeit dieses arteriellen Thrombosemodells..	68
4.3	Tierbeobachtung und EMD 26644-Serumspiegel..	69
4.4	Allgemeine und hämostatisch relevante Parameter.....	74
5.	<u>Zusammenfassung</u>	82
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	83
7.	<u>Lebenslauf</u>	90

1. Einleitung

Erkrankungen durch arterielle und venöse Thrombosen sind im Laufe der letzten Jahrzehnte zur häufigsten Todesursache in westlichen Industrieländern geworden. Durch große Anstrengungen in der epidemiologischen Forschung sind gesicherte statistische Zusammenhänge zwischen bestimmten "Risikofaktoren" (z.B. Rauchen, Hypertonie, Hypercholesterinämie, manifester Diabetes mellitus) und der Wahrscheinlichkeit der Erkrankung an einer obliterierenden, stenosierenden Arteriopathie gefunden worden. Bei der Suche nach den frühesten Veränderungen in der Atherogenese haben die Blutplättchen immer mehr an Interesse und Bedeutung gewonnen(7, 26,44,46). Inzwischen gibt es viele Anhaltspunkte, daß nicht nur stark veränderte Endotheloberflächen oder Kollagenstrukturen eine vermehrte Thrombozytenhaftung auslösen können, sondern daß dies bereits auch bei intaktem Endothel und Vorliegen von Risikofaktoren auftreten kann (13,16,17,30). Demnach werden die initialen Vorgänge bei der Entstehung der arteriellen Verschlusskrankheit nicht mehr allein in oder auf der Gefäßwand (nach den prinzipiellen Vorstellungen von Anitschkow und Rokitanski), sondern in einer Störung der in einem Gleichgewicht sich befindlichen

Beziehung von strömendem Blut und Gefäßwand gesehen (38). Offenbar kommt dem Adhärenzwerden der Thrombozyten auf dem Arterienendothel dabei eine Schlüsselstellung zu.

Es sind verschiedene Substanzen bekannt, welche die Funktion und die Überlebenszeit der Thrombozyten und somit einen möglichen ersten Schritt in der Atherogenese, nämlich deren Adhäsion und Aggregation beeinflussen (25,32,52). Wichtige Befunde aus neuerer Zeit deuten aber auch darauf hin, daß die antithrombotische Wirkung der untersuchten Präparate nicht nur auf ihrer Plättchenaktivität, sondern auch auf einer Endothelschutzwirkung beruht (21,27).

Sowohl zur Erforschung der Arterioskleroseentstehung wie auch zur Prüfung von Medikamenten müssen Modellversuche angestellt werden, da diesbezügliche Untersuchungen aus offenkundigen Gründen wenigstens nicht primär am Menschen durchgeführt werden können. Tiere sind deshalb, wenn die für die jeweilige Fragestellung geeignetste Tierart ausgesucht wurde, ein bewährtes Testobjekt. Für die Erforschung der Atherogenese ebenso wie zur Testung von Medikamenten (6,35) sind Schweine hochwertige Versuchstiere (35,37), die nicht nur enge Parallelen zum menschlichen Stoffwechsel und Herz-Kreislaufsystem zeigen(40), sondern auch in Pflege, Haltung und Kosten noch tragbar sind. An unserer Klinik wird seit 1967 mit den Hanford-

Miniaturschweinen gearbeitet.

In der vorliegenden Untersuchung an Hanford-Miniaturschweinen sollte ein neues In-vivo-Thrombosemodell entwickelt und am Beispiel eines oral zugeführten Mercaptooxacolyldicarbonsäure-Derivats mit thrombozytenaggregations- und -adhäsionshemmender Aktivität geprüft werden (28). Um den Wert dieser Substanz zur arteriellen Thromboseprophylaxe zu testen und um weitere für den Menschen eventuell gefährliche Wirkungen zu erkennen, wurde diese Substanz (EMD 26644, s.u.) in einer relativ hohen Dosis an 8 Miniaturschweine oral über 10 Tage verabreicht; dabei wurden wichtige humorale Daten und das Verhalten der Versuchstiere beobachtet. Als Thrombosemodell in vivo diente der lokale Eisreiz ("Kälteangiitis" (26)) der freigelegten a.carotis und femoralis vor und nach der Medikamentenperiode und bei einer unbehandelten Kontrollgruppe. Die Beurteilung der präparierten Gefäße erfolgte mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM). In dieser Studie wurde erstmals von uns versucht, die durch das REM gewonnenen Bilder streng "blind" aufzunehmen und auszuwerten, um möglichst objektive Kriterien zur Prüfung dieses "Angiopathiemodells" und ggf. von Medikamenten zu gewinnen.

2. Material und Methodik

2.1 Vorbemerkungen

Verwendete Abkürzungen: REM bedeutet Rasterelektromikroskop(ie), rem bedeutet rasterelektronenmikroskopisch(e).

Mit Medikamententiere bzw. Medikamentengruppe werden diejenigen Versuchstiere bezeichnet, die während der Versuchsperiode mit dem Medikament EMD 26644 als Versuchs- oder Testsubstanz gefüttert wurden. Unter Kontrolltiere bzw. Kontrollgruppe waren die Tiere verstanden, die die Testsubstanz während der Versuchsperiode nicht erhielten. In den Tabellen heißt vor bzw. nach Fütterung soviel wie vor Beginn bzw. am Ende der Versuchsperiode. In der Arbeit und in den Tabellen werden als Maßeinheiten die SI - Einheiten benützt. Im Tabellenvorspann stehen die jeweiligen Umrechnungsfaktoren.

2.2 Versuchstiere

Die für die Untersuchungen verwendeten Hanford-Miniaturschweine (ursprünglich 1958 in den Hanford-Laboratorien in den USA für experimentelle Zwecke gezüchtet) wurden im Institut für Tierhygiene der Universität München gezüchtet. Die Versuche wurden an 11 Hanford-Schweinen beiderlei Geschlechts durchgeführt. Bei den Medikamententieren handelte es sich um 7 männliche (1 unkastriert, 6 kastriert)

und 1 unkastriertes weibliches Tier. Die Kontrollgruppe bestand aus 1 unkastrierten männlichen und 2 unkastrierten weiblichen Tieren. Das mittlere Körpergewicht der Medikamentengruppe betrug bei Versuchsbeginn $36,1 \pm 12,3$ kg, das der Kontrollgruppe $39,5 \pm 9,6$ kg. Das Alter lag zwischen 4 - 8 Monaten. Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Tiere einzeln ohne Auslauf gehalten.

2.3 Versuchssubstanz

Bei der verwendeten Testsubstanz handelte es sich um das von der Firma E. Merck, Darmstadt, als Anti-phlogistikum entwickelte EMD 26644, ein Mercapto-oxacollylcarbonsäurederivat (Abb. 1).

Da bekanntlich auch andere nicht-steroidale Anti-phlogistika eine thrombozytenaggregationshemmende Wirkung haben, war es naheliegend, EMD 26644 bezüglich der Wirkung auf hämostatisch relevante Parameter zu überprüfen. In zahlreichen In-vivo- und In-vitro-Versuchen bei Tieren und auch bei gesunden freiwilligen Probanden sowie an arteriellem Verschußleiden erkrankten Patienten wurde das Medikament getestet. Es stellte sich eine gute Wirkung auf die Hemmung von Thrombozytenaggregation und -adhäsion bei relativ geringen Nebenwirkungen heraus (1,11 μ -n, 28,43). Die Substanz war in vergleichsweise niedrigerer Dosis wirksam als Acetyl-

salicylsäure, welche sich bisher als einziger zuverlässiger Hemmer der Thrombozytenaggregation in praxi durchsetzte (3).

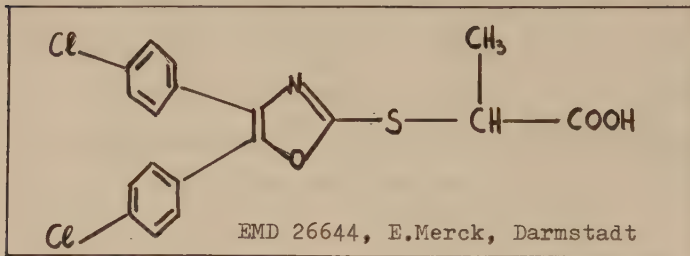


Abb. 1 Strukturformel von 2- 4,5-Bis(p-chlor-phenyl)-oxacoly-(2)-thio -propionsäure
 $=C_{18}H_{13}Cl_2NO_3S$. MG=394,3

2.4 Versuchsablauf, Untersuchungsprogramm

Bei allen Tieren wurde exakt der gleiche Ablauf des Untersuchungsprogramms während der Versuchsperiode eingehalten. Jede Versuchsperiode begann mit einer Operation (siehe 2.5), in welcher der für die möglichst streßfreie Blutentnahme wichtige Vena-cava-Katheter verlegt und zu Vergleichszwecken für die rem Untersuchung ein etwa 3-4 cm langes Stück der a.carotis und a.femoralis einer Seite - nach äußerer Reizung mit Eis - entnommen wurde. Außerdem wurde bei dieser Operation das Körpergewicht zur Festlegung der Medikamentendosis und die subaquale Blutungszeit an der Ohrspitze der narkotisierten Tie-

re bestimmt. Von der 1. Operation bis zu dem Tag, an dem die Ausgangswerte für die Laboruntersuchungen entnommen wurden, vergingen 3-4 Tage, sowohl in der Medikamenten- wie in der Kontrollgruppe. Bei dieser Blutentnahme unter Nüchternbedingungen wurden folgende Parameter bestimmt:

Klinisch-chemische Untersuchungen: Hämoglobin, Erythrozyten, Hb_E, Leukozyten, Blutzucker, Cholesterin, Triglyceride, SGOT, SGPT, Gamma-GT, alkalische Phosphatase, Gesamt-Bilirubin, Gesamt-Eiweiß mit Elektropherogrammen, Natrium, Kalium, Calcium, Harnstoff-N und Kreatinin.

Rheologische Untersuchungen: Hämatokrit, Viskosität von Blut und Plasma, Fibrinogen und Erythrozytenflexibilität.

Plättchenteste: Thrombozytenzahl, PAT und Fasertest.

In der Regel wurde einen Tag nach der 1. Blutentnahme mit der Verfütterung des Medikaments bzw. mit der Versuchsperiode in der Kontrollgruppe begonnen. Die tägliche Dosis von EMD 26644 betrug 12,5 mg/kg Körpergewicht. Die Testsubstanz wurde jeweils in der Zeit von 7.00 - 8.30 Uhr verfüttert; die Tiere waren bis dahin nüchtern.

Nachdem das erste Versuchstier (Nr. 160) das Medikament in der vorgegebenen Drageeform erhalten hatte, und wir beobachtet hatten, daß es die Dragees immer aus dem Futter warf, wurden bei allen

weiteren Versuchen die Dragees zu Reiskorngröße zerstoßen und in dieser Form verabreicht. Die Testsubstanz wurde mit einer geringen Menge des handelsüblichen DLG-Schweinemastfutters und etwas Wasser angeboten, wodurch die Aufnahme durch die Tiere hinreichend kontrolliert werden konnte. Anschließend wurde Futter und Wasser in freier Form wie bei den übrigen Tieren dargeboten.

Die Versuchsdauer mit bzw. ohne Medikament betrug 10 Tage. Bei je einem Versuchstier aus der Medikamenten- und Kontrollgruppe mußten die 10 Tage aus technisch-organisatorischen Gründen auf 11 Tage ausgedehnt werden (Nr.166 und Nr.186).

Am 7.Tag der Versuchsperiode wurde bei allen Tieren die 2. Blutentnahme vorgenommen, bei der folgende Werte bestimmt wurden:

Serumkonzentration des verfütterten Medikaments.

Rheologische Untersuchungen: Hämatokrit, Viskosität von Blut und Plasma, Fibrinogen und Erythrozytenflexibilität.

Plättchenteste: PAT und Fasertest.

Am 10. bzw. bei den erwähnten zwei Tieren am 11. Tag wurde schließlich die 3. Blutentnahme und die 2. Operation durchgeführt. Die Bestimmungen aus der 3. Blutabnahme waren dieselben wie bei der 1. Blutabnahme, dazu kam noch die Konzentrationsbestimmung des Medikaments im Serum.

Bei der 2. Operation erfolgte nach Reizung der Gefäßwand von außen mit Eis die Entnahme eines Stücks der a.carotis und a.femoralis jeweils der Gegenseite zur 1. Operation. Ebenso wurden Körpergewicht und subaquale Blutungszeit erneut bestimmt.

Bei 5 Versuchstieren aus der Medikamentengruppe wurde nach einer Erholungszeit von durchschnittlich 2-Tagen, in welcher die Tiere mit Normalfutter ohne Medikament ernährt wurden, eine Fütterungszeit von 10 - 12 Tagen mit einem sorgfältig gemischtem Fettfutter angeschlossen. Dieses Fettfutter setzte sich zusammen aus 2 Teilen DLG-Schweinemastfutter II und 1 Teil "Mica 80" (Fa. I.A.Meggle, Reitmehring), bestehend aus 80 % Schweineschmalz, dazu 3 Gew.-% Cholesterin und 3 Gew.-% Cholinchlorid (Fa.Merck, Darmstadt). Unabhängig vom Körpergewicht erhielten dabei die Tiere täglich 40 mg der Testsubstanz EMD 26644. Am Ende der Fett-Fütterungszeit wurde wieder eine Blutentnahme und eine Bestimmung aller der bei der 3. Blutentnahme aufgeführten Parameter vorgenommen. Am selben Tag wurde bei diesen fettgefütterten Tieren eine Vitalfixierung mit Glutaraldehyd in Narkose durchgeführt.

Eine tabellarische Zusammenfassung des Versuchsprogramms zeigt Tabelle 1, eine Darstellung des tatsächlichen Versuchsablaufs bei jedem einzelnen Tier ist aus Tabelle 2b, Teil 1 und 2 ersichtlich.

Tabelle 1 Ablauf des Versuchsprogramms
und durchgeführte Untersuchungen.

Tag	Programm	Untersuchungen
1	1. Operation: Verlegung des vena-cava-Kath.	Körpergewicht, subaquale Blutungszeit, Gefäßentnahmen,
3 4	1. Blut= abnahme	Klin.-chem. Untersuchg., Rheologische Untersuchg., Plättchenteste,
5	Beginn der Fütterungsperioden mit bzw. ohne Medikament	
11	2. Blutabnahme	Serumspiegel d. Medikam., Rheologische Untersuchg., Plättchenteste (ohne Thrombozytenzahl)
14	3. Blutabnahme und 2. Operation	Serumspiegel d. Medikam., Rheologische Untersuchg., Plättchenteste, Klin.-chem. Untersuchg., Körpergewicht, subaquale Blutungszeit, Gefäßentnahmen,
17 18 19	Fettfutterge= misch mit 40 mg des Medikaments täglich	
29 30	4. Blutabnahme und 3. Operation	Laboruntersuchung wie bei der 3. Blutabnahme, Vitalfixierung mit Glutaraldehyd, Gefäßentnahmen, Gewichtsbestimmung, subaquale Blutungszeit

Tabelle 2a Erläuterung der in Tab. 2b benützten
Abkürzungen.

Operationen:

VCK	Verlegung des Vena-cava-Katheters
VJK	Verlegung eines Katheters in die linke v.jugularis
INT	Intubationsnarkose vor Thorakotomie
VF	Vitalfixierung mit Glutaraldehyd
cli/re	a.carotis links/rechts entnommen
fli/re	a.femoralis links/rechts entnommen
riv	ramus interventricularis entnommen
15/20	Dauer des Eisreizes in Minuten

Blutabnahmen:

BK	Blutabnahme über Katheter
BP	Blutabnahme durch Punktion des truncus brachiocephalicus

Reizarten:

ER	Eisreiz(Würfel von etwa -8°C und 2 cm Kantenlänge)
StR	Stromreiz(definiert in Abschnitt 2.5)

Fütterung:

Med	Beginn der Medikamentenfütterung
Vgl	Beginn der Fütterung ohne Medikament
Fett	Beginn der Fettfütterung + 40 mg Medika= ment

Tabelle 2b Tatsächlicher Versuchsablauf bei allen Versuchstieren.

Teil 1: Medikamententiere

Nummer der Versuchstiere				
Tag	160	161	164	165
1	VCK	VCK, ER, cre15 fre10.	VCK, ER, cre20 fre15.	VCK, ER, cre20 fre15.
2				
3			BK	BK
4			BK	Med
5	BK		Med	
6	ER, oli15, fli10.	BK		
7		Med		
8	Med			
9				
10				BK
11			BK	
12				
13		BK		BK, ER, oli20 fli15.
14	BK		BK, ER, oli20 fli15.	
15				
16		BK, ER, oli15 fli10.		Fett
17	BK, ER, cre15 fre10.	Fett		
18			Fett	
19				
20				
21				
22				
23				
24		BP, VF, riv		BK, VF, riv
25				
26				
27				
28				
29				
30			BK, VF, riv	

Fortsetzung Tabelle 2b, Teil 1: Medikamententiere

Tag	Nummer der Versuchstiere			
	166	167	169	172
1	VCK, ER, cre20 fre15.	VCK, StR cre, ER fre15.	VJK, ER, cli20 fli15.	VCK, ER, cre20 fre15.
2				
3				BK
4				BK
5	BK, Med			Med
6		BK	BK	
7		Med	Med	
8				
9				
10				
11	BK			BK
12				
13		BK	BP	
14				BK, ER, cli20
15	BK, ER, cli20 fli15.			fli15, INT, riv5.
16		BK, StR cli, ER fli15.	BP, ER, cre20 fre15, riv5.	
17				
18				
19	Fett	Fett		
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29		BP, VF, riv		
30				
31	BP, VF			

Tabelle 2b Tatsächlicher Versuchsablauf bei allen Versuchstieren.

Teil 2: Kontrolltiere

Tag	Nummer der Versuchstiere		
	176	183	186
1	VCK, ER, cre20 fre15.	VCK, ER, cre20 fre15.	VCK, ER, cre20 fre15.
2			
3			
4		BK	BK
5	BK	Vg1	Vg1
6	Vg1		
7			
8			
9			
10			
11		BK	BK
12	BK		
13			
14		BK, ER, c1120 f1115, INT, riv5.	
15	BK, ER, c1120 f1115, INT, riv5.		BK, ER, c1120 f1115, INT, riv5.

2.5 Operationen, Blutentnahmen

Bei den unter sterilen Bedingungen durchgeführten Operationen wurde grundsätzlich ein Operationsprotokoll angefertigt und folgendermaßen vorgegangen: Die nüchternen Tiere wurden mit einer speziell für Schweine entwickelten Kombinationsanästhesie narkotisiert (41). Die Kombination setzte sich zusammen aus dem Hypnotikum und Muskelrelaxans Methomidat (Hypnodil^R, Janssen GmbH, Düsseldorf) und aus dem Sedativum Azaperon (Stresnil^R, Janssen GmbH, Düsseldorf). Zur Narkoseeinleitung bei der 1. Operation wurden von Hypnodil^R pro 20 kg geschätztes Körpergewicht 4 ml intraperitonäal und 1 ml Stresnil^R intramuskulär appliziert. Nach einer Zeitspanne von 5 - 10 Minuten lagen die Tiere im Narkoseschlaf und konnten für die Operation vorbereitet werden. Erster Operationsschritt war immer - nach i.m. Verabreichung von 0,5 mg Atropin - die Verlegung eines silikonisierten Katheters in die v.cava cranialis bis nahe dem rechten Herzvorhof via rechte v.jugularis externa. Am Schluß der Operation wurde dieser Blutentnahmekatheter mit einer an unserer Klinik üblichen Methode subkutan zum Nacken verlegt und dort herausgeführt (34,40,41). Dort wurde das etwa 4 cm über den Nacken ragende Katheterende mit einem Haltefaden fixiert.

Im 2. und 3. Operationsschritt wurden nach lokaler

äußerer Eisreizung der vorsichtig freipräparierten Arterien 3 - 4 cm lange, in ihrer ursprünglichen Länge auf Korkplättchen fixierte Stücke der rechten a.carotis und a.femoralis entnommen. Vom Operateur wurden die Gefäßpräparationen nach bestimmten Kriterien mit den Noten 1 bis 5 benotet (Abb.2). Nur Gefäße mit der Note 1 und 2 gingen uneingeschränkt in die Auswertung ein, Gefäße mit der Note 5 wurden grundsätzlich verworfen. Gefäße mit der Note 3 sollten nur dann verwertet werden, wenn ihr Befund dem von Gefäßen mit Note 1 oder 2 aus dem gleichen Versuch entsprach. Die mit Note 4 bewerteten Präparate gingen in die Untersuchung nur bei intaktem Endothel ein.

Note	Kriterium
1	Entnahme leicht, rasch, einwandfrei
2	Entnahme einwandfrei, aber etwas langwierige Präparation (z.B.Nebenäste)
3	Entnahme schwierig und langwierig, aber keinerlei Verletzungen
4	Entnahme sehr schwierig, Abriß von Nebenästen mit Blutungen
5	Erhebliche Traumatisation des Hauptgefäßes mit stärkeren Blutungen

Abb.2 Beurteilungskriterien für die Gefäßentnahmen.

Der Eisreiz war genau festgelegt: die Eiskwürfel hatten eine Kantenlänge von 2 cm und eine Temperatur von etwa -8°C . Bei den ersten beiden Versuchstieren wurde die a.carotis jeweils 15 Minuten, die a.femoralis jeweils 10 Minuten mit Eis gereizt. Bei allen folgenden Tieren verlängerte sich die Reizdauer um je 5 Minuten. Bei einem Tier aus der Medikamentengruppe (Nr.167) wurde die a.carotis vor Entnahme mit Stromstößen gereizt. Dauer und Stärke der Stromstöße waren genau festgelegt und betrugen bei 100 V 2mal 0,5 Sekunden, bei 200 V 3mal 1 Sekunde. Bis zur Entnahme der Gefäße wurde jeweils 15 Minuten gewartet.

Nach Entnahme wurden die Gefäße an der dem Reiz zugewandten Seite in Längsrichtung aufgespalten, mit Nadeln auf dem schon in situ benützten Korkplättchen plan und spannungsfrei befestigt und mit körperwarmer Pufferlösung behutsam gespült. Danach sofortige Fixierung mit Glutaraldehyd in Natriumphosphat-Puffer.

Am Ende jeder Operation, die im Durchschnitt 2 Stunden dauerte, wurden in den Vena-cava-Katheter 10000 IE Heparin instilliert.

Bei der 2. Operation wurde genauso vorgegangen, jedoch konnten nun die Tiere mit einer intravenösen Narkoseeinleitung für die Operation vorbereitet werden. Pro 20 kg des bei der 1. Operation festge-

legten Körpergewichts wurden nun 2 ml Hypnodil^R i.v. und 1 ml Stesnil^R i.m. verabreicht. Im 1. und 2. Operationsschritt wurden die a.carotis und a.femoralis der Gegenseite mit denselben Reizen wie bei der 1. Operation behandelt und dann entnommen.

Waren die Tiere für den Fettfütterungsversuch vorgesehen, dann schloß die Operation mit der Instillation von 10000 IE Heparin in den Vena-cava-Katheter. Ein Versuchstier wurde im Anschluß an die 2. Operation (Nr. 161) durch intrakardiale Bolusinjektion von 40 ml einer 1-molaren Kaliumchlorid-Lösung getötet.

Die Tiere Nr. 169, 172, 176, 183 und 186 wurden bei der 2. Operation in einem 3. Operationsschritt intubiert, und es wurde nach Thorakotomie der ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie nach 5 Minuten Eisreiz intra vitam herauspräpariert und sofort fixiert.

Bei den mit Fettfuttermisch und 40 mg der Testsubstanz täglich gefütterten Tieren (Nr. 161, 164, 165, 166 und 167) wurde eine 3. Operation vorgenommen, in der mit Glutaraldehyd eine Vitalfixierung durchgeführt wurde: Über a.carotis und a.femoralis wurden zwei arterielle Zugänge geschaffen. Zum bestehenden venösen Zugang wurde noch ein zweiter angelegt (Abb.3). An den a.carotis-Katheter wurde physiologische Kochsalzlösung und das Fixations-

mittel Glutaraldehyd, beides von Körpertempera-
tur, über ein Y-Stück angeschlossen. Mit Handpumpen
wurde in allen Flaschen Druck erzeugt. Nach Vor-
gabe von 10000 IE Heparin und vor Herzstillstand
durch intrakardiale Bolusinjektion von 40 ml einer
1-molaren Kaliumchlorid-Lösung wurde die Kochsalz-
lösung für etwa 30 Sekunden geöffnet; nach dem Herz-
stillstand wurde sofort auf Fixationsmittel umge-
stellt. Das am Femoralis-Katheter hängende Fixa-
tionsmittel wurde ebenfalls auf Druck gebracht und
nach 5 Minuten zugeschaltet. Insgesamt lief das
Fixationsmittel so rasch ein, daß etwa arterieller
Mitteldruck im Kreislaufsystem über 25 - 30 Minu-
ten aufrecht erhalten werden konnte. Nach Ab-
schluß der Vitalfixierung wurden Stücke der Bauch-
aorta über und unter dem Abgang der Nierenarterien
und der ramus interventricularis anterior der a.co-
ronaria sin. zur rem Begutachtung entnommen.

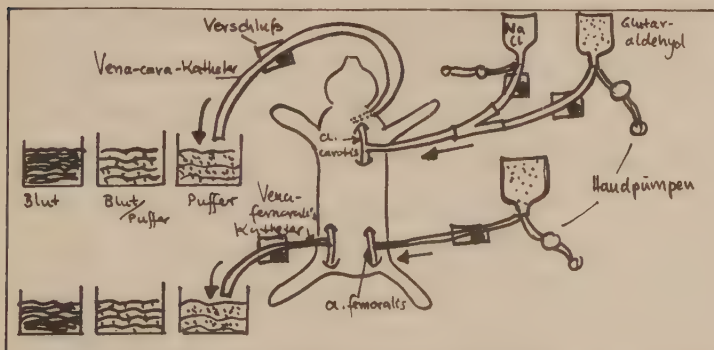


Abb. 3 Schema der Versuchsanordnung bei der Vital-
fixierung

Zwischen den Operationen und den Blutabnahmen wurde eine peinliche Katheterpflege und Wundpflege eingehalten. Die Katheter wurden alle zwei Tage mit physiologischer Kochsalzlösung auf Durchgängigkeit geprüft. Trotzdem kam es bei zwei Tieren, besonders am Ende der Fettfütterungsperiode, zu retrograder Verlegung des Katheters durch Ventilthromben.

Die Blutabnahmen wurden nach folgendem Schema am stets nüchternen Tier durchgeführt: Abnahme von 10 ml Blut- dann Abnahme der Proben - Reinjektion des zu Beginn entnommenen Blutes - Auffüllen des Katheters mit einem Gemisch aus 10000 IE Heparin und 3 ml Kochsalzlösung - Pudern der Katheterwunde mit Refobacin-Puder^R.

Die Instillation von Heparin unterblieb nach der 3. und 4. Blutentnahme, d.h. am Tag der 2. und 3. Operation. An diesem Tag wurde nur mit physiologischer Kochsalzlösung gespült.

Nach der Blutabnahme wurde den Tieren das Medikament und Futter bzw. nur Futter verabreicht. Vor der 2. Operation wurde das Medikament mit ganz wenig Futter angeboten, so daß sichergestellt war, daß die Testsubstanz rasch gefressen wurde. Die Tiere in der Kontrollgruppe erhielten vor der 2. Operation die gleiche Menge Futter ohne Medikament.

Die abgenommenen Blutmengen lagen bei etwa 65 ml vor Beginn der Versuchsperioden zur Bestimmung der

Ausgangswerte, 55 ml am 7. Tag und 75 ml am 10.Tag. Wurden die Tiere mit dem Fettfuttermittel weitergefüttert, so wurden am Tag der Vitalfixierung nochmals 75 ml Blut abgenommen. Die Tiere verloren somit innerhalb von 10 - 12 Tagen etwa 190 ml Blut, das sind je nach Körpergewicht 5 - 9 % des totalen Blutvolumens (33).

Trotz der intensiven Katheterpflege war es bei einem Tier aus der Medikamentengruppe (Nr. 169) nicht möglich, am 7. und 10.Tag das Blut durch den Venacava-Katheter zu entnehmen. Während einer intravenösen Hypnodil^R-Kurzarkose wurde der truncus brachiocephalicus punktiert und das nötige Blut entnommen.

2.6 Labor- und Untersuchungsmethoden

Gesamt-Bilirubin, SGOT, SGPT, alkalische Phosphatase, Gamma-GT, Kreatinin, Harnstoff-N, Cholesterin, Triglyceride, Na, K, Ca, Gesamt-Eiweiß mit Elektropherogrammen, Blutzucker, Hämoglobin, Erythrozyten und Leukozyten wurden im Kliniklabor nach üblichen Methoden und mit dem Autoanalyser (Sma Plus^R, Technicon, USA) bestimmt.

Der Hämatokrit wurde mit Mikrokapillaren in der Hämatokritzentrifuge gleich nach der Blutentnahme festgestellt.

Die Blut- und Plasmaviskosität wurde aus EDTA-Blut mit dem Wells-Brookfield-Microviscometer in einer

Modifikation nach Schmid-Schönbein (49) bestimmt.

Die Blut- und Plasmaviskositätsbestimmung wurde jeweils bei 6 und 60 Umdrehungen pro Minute durchgeführt, wobei 6 Umdrehungen einem Schergrad von $7,8 \text{ s}^{-1}$ und 60 Umdrehungen einem Schergrad von 78 s^{-1} entsprechen.

Gemäß den Vorschriften des PAT I nach Breddin (4) wurde die spontane Plättchenaggregation getestet. Unter Berücksichtigung der Bedingungen beim Minia-turschwein waren die Beurteilungskriterien abgewandelt worden (42). Die Stufeneinteilung ist aus Abb. 4 ersichtlich.

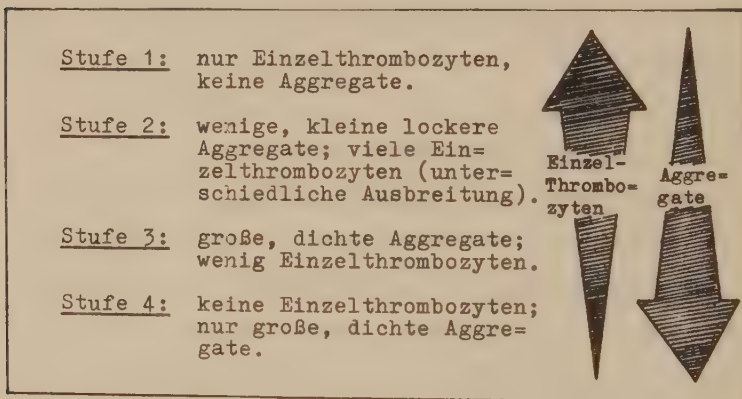


Abb. 4 Stufeneinteilung und Beurteilungskriterien für den PAT I nach Breddin, in Abwandlung für die Bedingungen beim Hanford-Schwein.

Zur genaueren Beurteilung und feineren Abstufung bei der statistischen Auswertung wurde noch ein

Faktor bestimmt, der mit folgender Formel ausgerechnet wurde:

$$F = \frac{(\text{PAT-Stufe}) \times (\text{Zahl der Aggregate pro Blickfeld})}{(\text{Zahl der Einzelthrombozyten pro Blickfeld})}$$

Die Prüfung der Erythrozytenflexibilität wurde nach einer Methode von Grigoleit (19) mit einem 5 μ m Microporefilter durchgeführt.

Die Fibrinogenbestimmung erfolgte nach der Methode von Clauss.

Die Zahl der Thrombozyten wurde in der Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

Aus Citratblut wurde unter Anwendung des Faser-tests nach Jacobi (29) die Thrombozytenadhäsivität bestimmt. Bei diesem Test werden innerhalb von 30 Sekunden 1,04 ml Citratblut über einen Nylon-Faden perfundiert und die Menge des am Faden haften gebliebenen Proteins nach vorheriger Hämolyse photometrisch bestimmt. Die Einheit ist μ g Plättchenprotein.

Dieser Test war während des Versuchsprogramms erst im Aufbau begriffen, so daß einige Bestimmungen aus personellen und technischen Gründen nicht durchgeführt werden konnten.

Die subaquale Blutungszeit wurde immer vom gleichen Untersucher bestimmt, indem mit dem Hämosti-lett in die Ohrspitze des narkotisierten Tiers gestochen wurde; die Narkosedauer hatte bis dahin 15 Minuten noch nicht überschritten. Sofort nach

dem Einstich wurde die Ohrspitze in körperwarmes Wasser getaucht und die Zeit bis zum völligen Sistieren der Blutung gestoppt. Diese Methode ist genauer als die Bestimmung der Blutungszeit nach Duke, bei der die austretenden Blutstropfen laufend mit einem Filterpapier abgetupft werden (31).

Für die Bestimmung der Serumkonzentration des Medikaments (EMD 26644) wurden jeweils 8-10 ml Blut abgenommen und zentrifugiert. Nach Einfüllen von je 1 ml Plasma in zwei verschraubbare Gläser wurden diese sofort tiefgefroren. Die Bestimmungen erfolgten durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (11f) im Institut für experimentelle Arzneimittelforschung in Grafting bei München. Die Einheit ist $\mu\text{g/ml}$ Serum.

Die entnommenen Gefäßpräparate wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop (Cambridge Stereoscan Mark II^R) untersucht. Beim REM wird ein sehr feiner stark gebündelter Elektronenstrahl zeilenweise mittels elektromagnetischer Ablensysteme über die Objektoberfläche geführt. Die auftreffenden Elektronen führen zu einer Emission von Sekundärelektronen, deren Stärke Rückschlüsse auf die einzelnen Oberflächenstrukturen zuläßt, indem in einem Szintillator Lichtblitze erzeugt werden, die über einen Verstärker auf einem Bildschirm die Helligkeit eines Bildpunktes steuern (2). Ein be-

sonderes Merkmal der rem Bilder ist ihre außerordentliche Tiefenschärfe bei einem noch relativ hohem Auflösungsvermögen von etwa 15 nm. Durch diese Eigenschaft bot sich das REM für Untersuchungen auf anatomischem Gebiet an.

In unseren Untersuchungen interessierten vor allem Thrombozytenadhäsionen bzw. -aggregate, Fibrinauflagerungen und ggf. Endothelveränderungen.

Die Assistentin war angewiesen, die Präparate nach folgendem Schema abzusuchen: jede Ecke und die Mitte des Gefäßpräparates. An jedem Punkt wurden eine Übersichtsaufnahme und 1-2 Aufnahmen in Vergrößerung zur Thrombozytenidentifikation angefertigt (Abb.5). Der Ort des Eis- bzw. Stromreizes am Gefäß konnte sehr genau angegeben werden und so bei der Anfertigung der Bilder berücksichtigt werden (Abb.6).

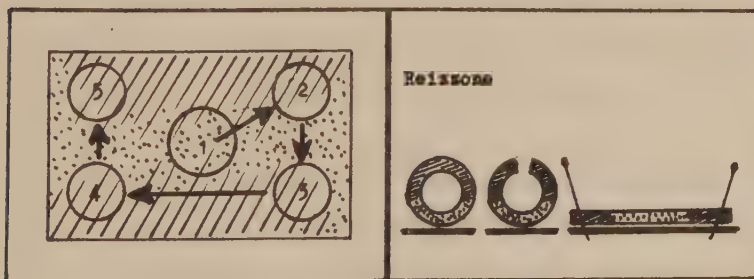


Abb. 5 Suchpunkte und Vorgehen bei der Anfertigung der rem Bilder am aufgespannten Präparat. Orte der stärksten Reizung schraffiert.

Abb. 6 Reizzone (schraffiert) am Gefäßpräparat.

2.7 Statistik, Auswertung

Die Standardabweichungen wurden immer als einfache Sigmagrenzen ($\pm s$) angegeben.

Die Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte mit dem t-Test nach Student zum Vergleich von Versuchsgruppen bzw. zum Vergleich von Versuchspaaren bei etwa normal verteilten Einzelwerten und etwa vergleichbarer Varianz der Versuchsgruppen. Für die Auswertung der Tierbeobachtung wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet (5). Als Signifikanzgrenze galt $p < 0,05$.

Die einzelnen Gefäßpräparate wurden in verschlüsselter Reihenfolge im REM untersucht, so daß die Assistentin nicht wußte, um welches Präparat es sich handelte; damit wurde größtmögliche Objektivität bei der Aufnahme angestrebt. Ebenso verfahren wir bei der Bewertung der Aufnahmen, die von zwei Untersuchern getrennt schriftlich beurteilt wurden, wobei den Untersuchern nicht bekannt war, zu welcher Kategorie die Bilder gehörten. Danach erst erfolgte die Zuordnung zur Kategorie "vor Versuchsperiode" oder "nach Versuchsperiode". Bei der Durchsicht der rem Bilder erfolgte eine Bewertung nach folgender Stufenskala:

Stufe	Beschreibung von	
	Thrombozyten(=T)	Endothel(=E)
1	mit Sicherheit keine T.	E. ist glatt, flach und unverletzt.
2	dargestellte Strukturen sind der Größe und Form nach keine T.	wie 1, aber unregelmäßige Oberflächenstrukturen, kleine Protuberanzen an den E.-Zellen.
3	wie 2, aber Tendenz zu Stufe 4.	bauchige E.-Zelleiher, evtl. monocytaire Elemente, Zellgrenzen deutlich.
4	typische Einzel-T., aber noch keine typ. T.-adhäsionen.	wie 3, mit Fibrinauflagerungen.
5	typische, mäßige bis reichliche T.-adhäsionen.	Spalten zwischen den E.-Zellen, kugelige E.-Zellen, Schrumpfnekrosen.
6	massenhaft T.-adhäsionen.	wie 5, mit reichlich Fibrinauflagerung.

Bei der Auswertung der rem Bilder standen viele Beispiele zur Verfügung, welche eine Identifizierung der uns interessierenden Strukturen ermöglichten (12, 14, 15, 38, 39, 45, 50).

Das rem Bild eines Arterienendothels beim Miniaturschwein läßt zahlreiche in Längsrichtung orientierte, ovale, rundliche, bisweilen bauchige Erhabenheiten erkennen, die mit einer Größe von etwa $14 \times 10 \mu\text{m}$ den Endothelzellkernen entsprechen. Bisweilen kann die Form der Zellkerne stark schwanken, z.B. bauchiger und kürzer in der Randzone einer lädierten Endothelfläche (nach Stromstoß). Auch kugelig ins Lumen

vorrangende Zellen mit einer Größe von 4-5 μm konnten als abschilfernde Zellen des Endothels identifiziert werden. Bei der Zuordnung dieser Zellen standen auch Monozyten zur Debatte (18); wegen Zweifel an der Identität wird jedoch allgemein von sog. monocytoiden Zellen oder monocyitären Elementen gesprochen (48). Bei fast allen rem Aufnahmen von den lokal mit Eis gereizten Arterien fanden sich im gereizten Abschnitt auf den Endothelzellen kleine Vorsprünge, die sich wegen ihrer geringeren Größe deutlich von Thrombozyten abgrenzen ließen. Offenbar gehörten sie den Endothelzellen an. In neueren transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen, bei denen mit besserem Auflösungsvermögen dickere Schichten als mit der herkömmlichen Elektronenmikroskopie befundet werden können, zeigten sich nach lokalem Eisreiz zahlreiche Vesikelbildungen in der Endothelzelle zur Lumenseite hin. Einerseits erklärt dies möglicherweise die beobachteten Protuberanzen der Deckzellen (36), andererseits kommt zum Ausdruck, daß trotz im REM intakter Endotheloberfläche die gesamte Gefäßwand reagiert (auch Myozyten und deren abgeschnürte Fortsätze sowie Monozyten wurden registriert).

Die Thrombozyten stellten sich als etwa 1 bis 3 μm große Gebilde dar, die teils als Einzelgebilde, teils als Zusammenballung (=Aggregation) gefunden wurden. In ihrer Ruheform sind sie diskoide glatte

Korpuskeln mit einem mittlerem Längsdurchmesser von $2,4 \mu\text{m}$ und Querdurchmesser von $1,7 \mu\text{m}$. In visköser Metamorphose verringert sich der Längsdurchmesser gering auf $2,1 \mu\text{m}$ und der Querdurchmesser bleibt gleich oder verringert sich auf $1,3 \mu\text{m}$. Die Pseudopodien können fast bis zu $3 \mu\text{m}$ lang werden. Manchmal bilden die Pseudopodien dichte Netzwerke, die von Fibrinfäden oft schwierig abzugrenzen sind. Von anderen Zellen können die Thrombozyten gut unterschieden werden. Erythrozyten gleichen sich untereinander sehr, sind üblicherweise glatt, rund, bikonkav mit einem Durchmesser von $5,3 \pm 0,5 \mu\text{m}$. Die Leukozyten haben eine zottige Oberfläche, sind kugelig und messen im Mittel $5,2 \pm 1,2 \mu\text{m}$ (zum Größenvergleich siehe auch Abb. 7).

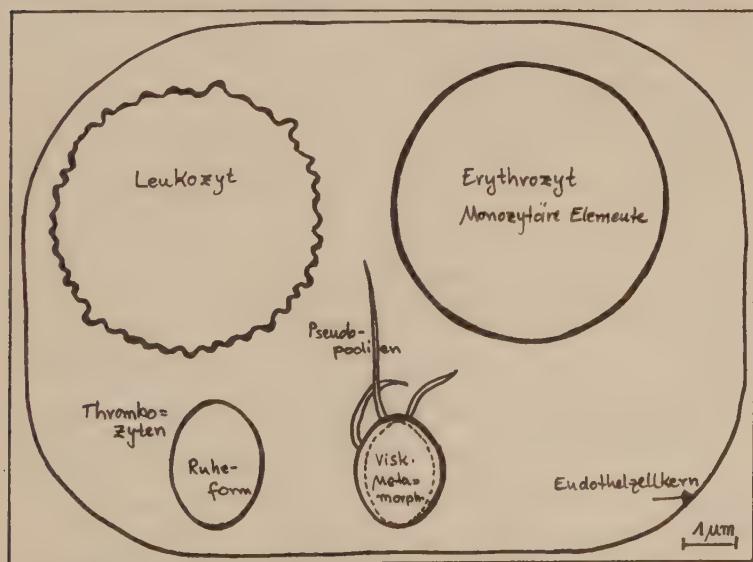


Abb. 7 Größenordnung rem interessanter Gebilde.

3. Ergebnisse

3.1 Versuchstiere

Bei beiden Versuchsgruppen bestand während der 10-tägigen Versuchsperiode ein deutlicher Gewichtsanstieg, um durchschnittlich 1,7 kg bei den Medikamententieren ($p < 0,01$) und um durchschnittlich 2,3 kg bei den Kontrolltieren ($p < 0,01$). Die Differenz zwischen beiden Gruppen nach der Versuchsperiode war nicht signifikant. (Tab. 3).

Während des Versuchsprogramms wurde bei allen Tieren das Verhalten beobachtet. Die beste Möglichkeit, das motorische Verhalten und das Freßverhalten der Tiere zu beurteilen, war der Vergleich mit den anderen Minischweinen im Stall und der Vergleich zwischen Kontroll- und Medikamentengruppe. Die langjährigen Erfahrungen des Tierpflegers wurden berücksichtigt. In der Kontrollgruppe war bei keinem Tier eine Störung der drei Beobachtungspunkte - Störung der Wundheilung, Dämpfung der Motorik, Verschlechterung des Freßverhaltens - zu bemerken. Dagegen zeigten sich bei sechs Tieren der Medikamentengruppe Störungen der Wundheilung, wie sie bei anderen Versuchen, bei denen auch Vena-cava-Katheter verlegt worden waren, nicht beobachtet werden konnten. Dies äußerte sich in eitrigen Belägen um die Nackenwunde bzw. in kleinen Abszessen an der Entnahmestelle von a.carotis bzw. a.femora-

Tabelle 3 Geschlecht, Gewichtsentwicklung

(m.=männlich, w.=weiblich, k.=kastriert, uk.=unkastriert)

Einheit: kg

Versuchs- tier-Nr.	Geschlecht	Körpergewicht		
		vor Fütterung	nach Fütterung	nach Fettfütterung
160	m.k.	34	36	-
161	m.k.	44	46	43
164	m.k.	62	65	62
165	m.k.	35	35	32
166	m.k.	36,5	38	31,5
167	m.k.	25	28	28
169	w.uk.	25	27	-
172	m.uk.	27,5	28	-
$\bar{x}_{160-172}$ $\pm s$		36,1 12,3	37,8 12,6	- -
$\bar{x}_{161-167}$ $\pm s$		40,5 13,8	42,4 14,2	39,3 13,9
176	m.uk.	29	32,5	-
183	w.uk.	48,5	52	-
186	w.uk.	41	41	-
$\bar{x}_{176-186}$ $\pm s$		39,5 9,6	41,8 9,7	- -

lis. Etwa ab der Mitte der Versuchsperiode war zu bemerken, daß sich die Tiere immer wieder an der Katheteraustrittsöffnung scheuerten; bei drei Tieren waren auch die Haltefäden für die Katheter aus dem entzündlich veränderten Gewebe ausgerissen oder herausgeleitet.

Das Freßverhalten war auch in der Medikamentengruppe kaum beeinträchtigt. Bei drei Tieren jedoch stellte sich ab 6./7. Tag eine Verschlechterung der Nahrungsaufnahme ein. Die Tiere waren kaum noch zum Fressen zu bewegen. Selbst Fütterung der betroffenen Tiere vor den noch im Stall befindlichen Minischweinen verschaffte keinen genügenden Anreiz. Die Tiere machten einen dösen, schläfrigen, in einem Fall (Nr.166) sogar stuporösen Eindruck. Insgesamt waren vier der acht Medikamententiere motorisch wesentlich gedämpfter als die anderen Versuchstiere. Dies wurde auch vom Tierpfleger, der über das Versuchsprogramm nicht informiert war, bestätigt (Tab. 4). Ein statistisch bedeutsamer Unterschied war jedoch bei keinem der drei Beobachtungspunkte zu sichern.

3.2 Serumkonzentrationen des Medikaments

Die Serumkonzentrationen des Mercaptooxacoly carbonsäurederivates (EMD 26644), die bei sechs Tieren bestimmt wurden, waren sowohl am 7. wie auch am 10.Tag sehr unterschiedlich (Abb.8 und Tab.5).

Tabelle 4 Tierbeobachtung
(+=ja, ∅=nein)

Versuchs- tier-Nr.	Wundheilung gestört	Motorisch gedämpft	Fressverhalten schlecht
160	+	+	∅
161	+	+	+ 1)
164	∅	∅	∅
165	∅	∅	∅
166	+	+ 2)	+ 1)
167	+	∅	∅
169	+ 3)	∅	∅
172	+	+	+ 1)
176	∅	∅	∅
183	∅	∅	∅
186	∅	∅	∅

1) Die Verschlechterung trat etwa ab 6./7. Tag ein

2) Erkrankte schwer; Erbrechen, Fieber, Stupor

3) Erst ab 9./10.Tag auffällig

Tabelle 5 Serumkonzentrationen der Testsub=
stanz EMD 26644
Einheit: $\mu\text{g/ml}$

Versuchs= tier-Nr.	Konzentration am 7. Tag	Konzentration am 10. Tag	Konzentration nach Fett= fütterung
160	2,73	4,90	-
161	4,86	2,60	0,51
164	6,37	9,57	0,71
165	6,98	7,05	0,91
166	2,48	1,65	0,24
167	1,53	5,29	0,45
169	-	-	-
172	-	-	-
$\bar{x}$ + - 160-167	4,15 2,2	5,17 2,9	- -
$\bar{x}$ + - 161-167	4,43 2,4	5,23 3,2	0,56 0,2

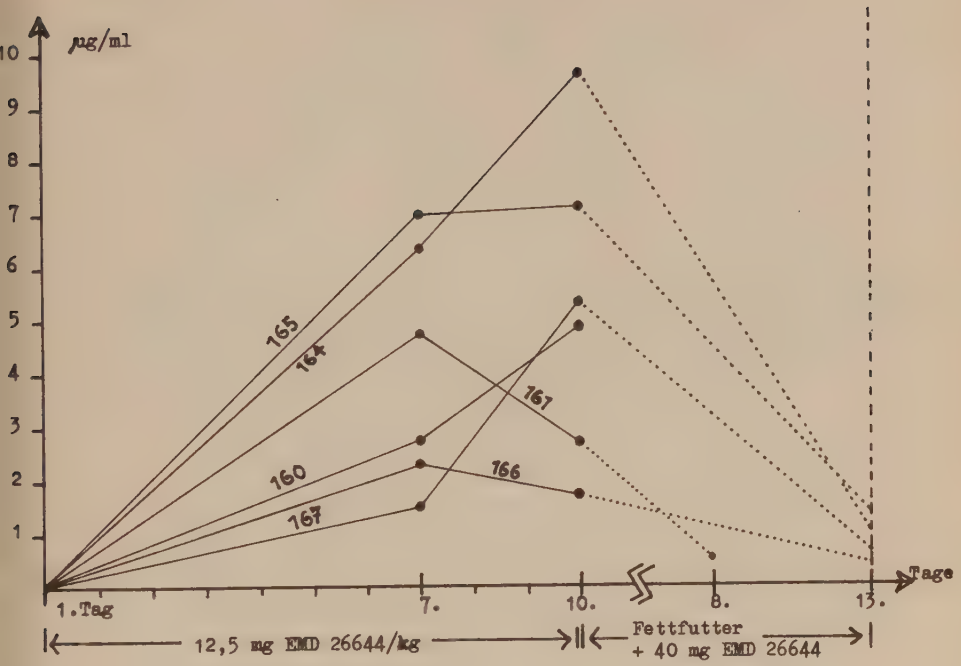


Abb. 8 EMD 26644 - Serumspiegel

3.3 Laboruntersuchungen

3.3.1 Klinisch-chemische Befunde

Beim Blutbild traten in der Medikamenten- wie in der Kontrollgruppe die gleichen Tendenzen auf: die Hämoglobinwerte und Erythrozytenzahlen lagen am 10.Tag gering niedriger als bei Beginn des Versuchsprogramms, während der mittlere Hb-Gehalt des Einzelerythrozyten (Hb_E) in beiden Gruppen am 10.Tag geringfügig erhöht war (Tab. 6). Deutlicher waren die Unterschiede bei den Leukozyten. Die Ausgangswerte waren in beiden Versuchsgruppen beinahe gleich (Tab. 7). Werden alle Tiere gleichermaßen berücksichtigt, so nahmen in der Medikamentengruppe die weißen Blutkörperchen im Mittel um 3,8 G/l, in der Kontrollgruppe um 0,8 G/l zu. Ohne die Versuchstiere Nr. 164 und 165, bei denen eine Wundheilungsstörung nicht zu beobachten war, und ohne das schwerst erkrankte Tier Nr. 166 waren die Leukozyten nach der 10-tägigen Medikamentenversuchsperiode um 6,8 G/l signifikant vermehrt (Abb. 9).

Die Blutzuckerwerte zeigten sich in beiden Versuchsgruppen vor und nach der Fütterungsperiode sehr konstant (Tab. 8).

Die Ausgangswerte für Cholesterin und Triglyceride waren bei den Kontrolltieren etwas, aber nicht signifikant höher als bei den Medikamententieren (Tab. 9). Während der Versuchsperiode traten keine

Tabelle 6 Hb, Hb_E, Erythrozyten

(Hb: g/100 ml x 0,6206 = mmol/l(Hb/4)
mmol/l x 1,6113 = g/100 ml

Hb_E: pg x 0,06206 = fmol/l(Hb/4)
fmol/l x 16,113 = pg

Erythrozyten: Mill/mm³ x 1 = T/l)

Einheiten: Hb : mmol/l

Hb_E : fmol/l

Ery : T/l

Versuchstier-Nr.	vor Fütterung			nach Fütterung			nach Fettfütterung		
	Hb	Ery	Hb _E	Hb	Ery	Hb _E	Hb	Ery	Hb _E
160	7,26	6,03	1,20	5,77	5,06	1,14	-	-	-
161	6,33	5,67	1,11	6,82	5,27	1,29	-	-	-
164	7,51	6,04	1,24	7,13	5,81	1,22	8,13	6,68	1,21
165	7,63	5,86	1,30	7,13	5,57	1,28	7,07	5,75	1,23
166	6,95	5,92	1,17	6,14	4,95	1,24	6,64	4,95	1,34
167	5,21	5,40	1,17	6,26	5,13	1,22	6,02	4,46	1,34
169	6,39	4,82	1,32	5,33	3,86	1,38	-	-	-
172	6,57	5,14	1,28	7,26	5,51	1,31	-	-	-
$\bar{x}_{160-172}$	6,56	5,61	1,23	6,48	5,14	1,26	-	-	-
$\pm_s$	0,74	0,44	0,07	0,71	0,59	0,07	-	-	-
$\bar{x}_{164-167}$	6,82	5,80	1,22	6,66	5,36	1,24	6,96	5,46	1,28
$\pm_s$	1,11	0,28	0,06	0,54	0,39	0,03	0,88	0,97	0,07
176	8,00	6,05	1,33	8,19	6,06	1,35	-	-	-
183	7,63	7,14	1,06	7,82	6,56	1,19	-	-	-
186	6,51	5,42	1,20	5,77	4,32	1,27	-	-	-
$\bar{x}_{176-186}$	7,38	6,20	1,20	7,26	5,64	1,27	-	-	-
$\pm_s$	0,77	0,87	0,13	1,30	1,17	0,08	-	-	-

Tabelle 7 Leukozyten
 (Zahl/mm³ x 0,001 = G/l
 G/l x 1000 = Zahl/mm³)
Einheit: G/l

Versuchs- tier-Nr.	vor Fütterung	nach Fütterung	nach Fettfütterung
160	19,7	35,3	-
161	17,3	20,4	-
164	14,6	15,5	16,5
165	17,2	16,8	13,6
166	19,8	15,6	9,7
167	12,5	17,2	21,6
169	16,1	19,4	-
172	19,3	26,6	-
$\bar{x}_{160-172}$ $\pm s$	17,06 2,6	20,85 6,8	- -
$\bar{x}_{164-167}$ $\pm s$	16,0 3,2	16,3 0,8	15,3 5,0
176	14,9	16,8	-
183	17,4	18,2	-
186	17,1	16,7	-
$\bar{x}_{176-186}$ $\pm s$	16,4 1,3	17,2 0,8	- -

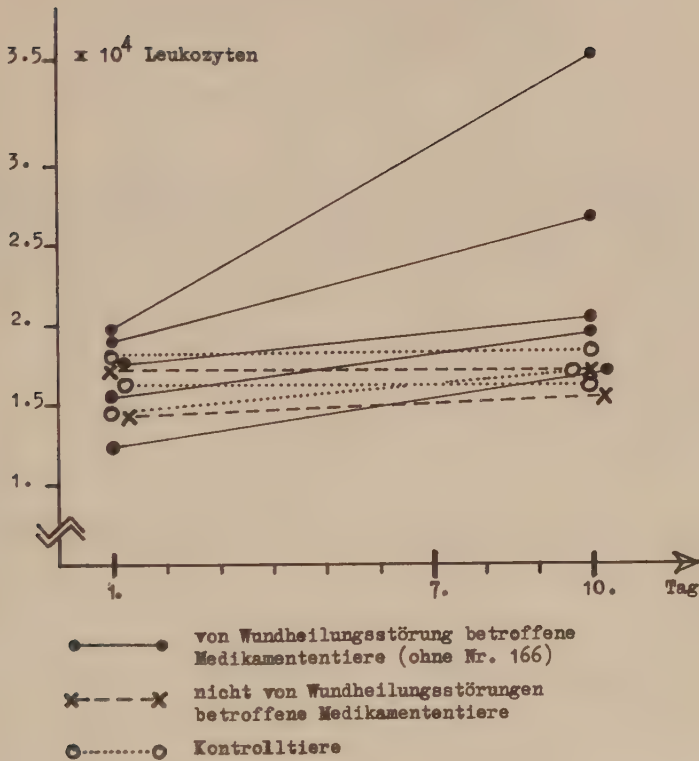


Abb. 9 Leukozytenzahlen vor und nach der Versuchsperiode

Tabelle 8 Nüchtern-Blutzucker

(mg/100 ml x 0,055 = mmol/l
mmol/l x 18,18 = mg/100 ml)

Einheit: mmol/l

Versuchs- tier-Nr.	vor Fütterung	nach Fütterung	nach Fettfütterung
160	3,57	4,40	-
161	4,40	4,95	4,40
164	3,30	3,19	3,30
165	3,74	3,85	3,85
166	4,84	3,74	4,67
167	4,67	4,12	4,67
169	3,41	2,75	-
172	4,51	3,30	-
$\bar{x}_{160-172}$	4,05	3,78	-
$\pm_{\text{m}}$	0,61	0,70	-
$\bar{x}_{161-167}$	4,19	3,97	4,17
$\pm_{\text{s}}$	0,65	0,64	0,59
176	3,85	4,45	-
183	4,12	3,85	-
186	3,57	4,12	-
$\bar{x}_{176-186}$	3,85	4,14	-
$\pm_{\text{m}}$	0,27	0,30	-

Tabelle 9 Cholesterin, Triglyceride

(Chol: $\text{mg}/100 \text{ ml} \times 0,0258 = \text{mmol}/\text{l}$
 $\text{mmol}/\text{l} \times 38,76 = \text{mg}/100 \text{ ml}$
 Trigl: $\text{mg}/100 \text{ ml} \times 0,01143 = \text{mmol}/\text{l}$
 $\text{mmol}/\text{l} \times 87,49 = \text{mg}/100 \text{ ml}$)

Einheiten: Cholesterin : mmol/l

Triglyceride: mmol/l

Versuchstier-Nr.	vor Fütterung		nach Fütterung		nach Fettfütterung	
	Chol.	Trig.	Chol.	Trig.	Chol.	Trig.
160	2,58	0,34	1,55	0,28	-	-
161	1,93	0,11	1,67	0,34	5,03	0,34
164	2,32	0,34	2,06	0,11	4,90	0,22
165	1,03	0,34	1,80	0,17	4,64	0,34
166	2,32	0,11	1,29	0,22	2,83	0,57
167	0,77	0,22	2,32	0,34	3,87	0,34
169	2,32	0,11	2,06	0,22	-	-
172	1,16	0,45	1,55	0,22	-	-
$\bar{x}_{160-172}$ $\pm s$	1,67 0,91	0,26 0,13	1,60 0,67	0,24 0,07	- -	- -
$\bar{x}_{161-167}$ $\pm s$	1,67 0,73	0,22 0,11	1,83 0,39	0,24 0,10	4,02 0,91	0,36 0,12
176	2,71	0,22	1,55	0,22	-	-
183	2,06	0,45	2,06	0,22	-	-
186	2,32	0,22	1,80	0,22	-	-
$\bar{x}_{176-186}$ $\pm s$	2,36 0,32	0,30 0,13	1,80 0,26	0,22 0,00	- -	- -

wesentlichen Veränderungen der Blutfette auf. Die mit Fettfuttermisch und 40 mg Medikament gefütterten Tiere zeigten einen signifikanten ($p < 0,01$) Anstieg der Cholesterinwerte um durchschnittlich 120 %. Der Triglyceridspiegel nahm um 52 % zu.

Bei den Nierenretentionswerten, Harnstoff-N und Kreatinin stieg der Mittelwert von Harnstoff-N bei den Medikamententieren insignifikant von 4,36 mmol/l auf 5,07 mmol/l, während er bei den Kontrolltieren -ebenfalls nicht signifikant- von 3,9 mmol/l auf 3,5 mmol/l fiel. Der Unterschied am Ende der Fütterungsperiode ist signifikant verschieden zwischen den beiden Versuchsgruppen. Die Kreatininwerte dagegen blieben bei beiden Versuchsgruppen konstant (Tab. 10 und Abb. 10).

Die Transaminasen SGOT und SGPT, die alkalische Phosphatase, die Gamma-GT und Gesamt-Bilirubin zeigten nach den Versuchsperioden in beiden Versuchsgruppen keine statistisch zu sichernden Veränderungen (Tab. 11).

Der Elektrolythaushalt blieb in beiden Versuchsgruppen unverändert stabil. Die Werte für Na^+ , K^+ und Ca^{++} waren in der Medikamenten- wie in der Kontrollgruppe nahezu identisch (Tab. 12).

Da entsprechende Daten von uns noch nicht erarbeitet waren, wurden für eine Normalwerterstellung der Gesamteiweißwerte und Eiweißfraktionen die Elektropherogramme von 24 Hanford-Schweinen ausgewertet

Tabelle 10 Harnstoff-N, Kreatinin

(Harnstoff-N: $\text{mg}/100 \text{ ml} \times 0,3561 = \text{mmol}/\text{l}$
 $\text{mmol}/\text{l} \times 2,808 = \text{mg}/100 \text{ ml}$

Kreatinin: $\text{mg}/100 \text{ ml} \times 88,4 = \mu\text{mol}/\text{l}$
 $\mu\text{mol}/\text{l} \times 0,0113 = \text{mg}/100 \text{ ml}$

Einheiten: Harnstoff-N: mmol/l

Kreatinin : $\mu\text{mol}/\text{l}$

Versuchstier-Nr.	vor Fütterung		nach Fütterung		nach Fettfütterung	
	Hst-N	K.	Hst-N	K.	Hst-N	K.
160	5,34	61,88	3,92	53,04	-	-
161	4,63	53,04	4,63	70,72	3,20	61,88
164	2,84	61,88	5,69	79,56	3,56	88,40
165	3,92	88,40	5,69	79,56	3,92	70,72
166	3,56	70,72	3,20	44,20	6,05	97,24
167	4,96	53,04	4,98	70,72	-	-
169	6,05	61,88	7,83	88,40	-	-
172	3,56	88,40	4,63	61,88	-	-
$\bar{x}_{160-172}$	4,36	67,18	5,07	68,06	-	-
$\pm_s$	1,07	14,14	1,38	14,14	-	-
$\bar{x}_{161-166}$	3,73	68,51	14,80	68,51	4,18	79,56
$\pm_s$	0,74	15,09	1,18	16,7	1,28	16,14
176	4,63	70,72	3,56	61,88	-	-
183	4,63	79,56	3,92	70,72	-	-
186	2,49	61,88	3,20	70,72	-	-
$\bar{x}_{176-186}$	3,92	70,72	3,56	67,18	-	-
$\pm_s$	1,21	8,84	0,35	4,42	-	-

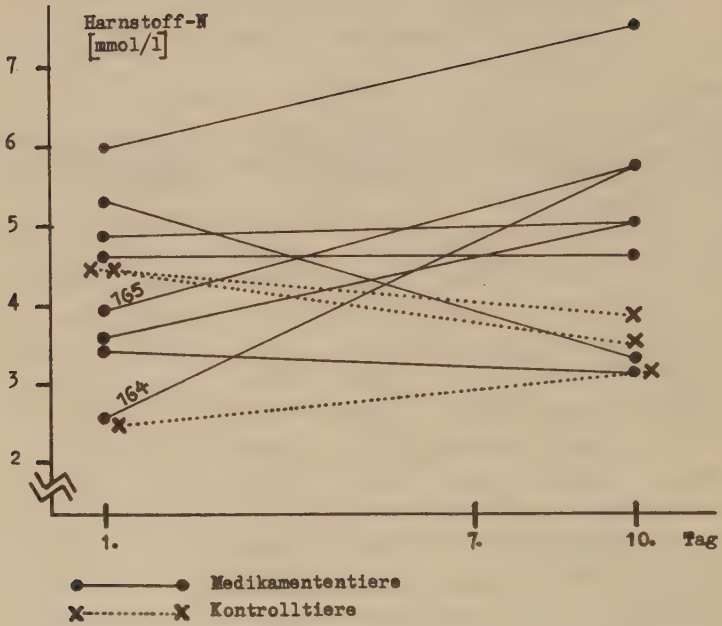


Abb. 10 Harnstoff-N vor und nach der Versuchs=
periode

Tabelle 11 Gesamt-Bilirubin, Alkalische Phosphatase,
SGOT, SGPT, Gamma-GT
(Bilirubin: mg/100 ml x 17,104 = umol/l
umol/l x 0,058 = mg/100 ml)
Einheiten: Bilirubin : umol/l
Alk. Phosphatase: U/l
SGOT, SGPT : U/l
Gamma-GT : U/l

Versuchs- tier-Nr.	vor Fütterung					nach Fütterung					nach Fettfütterung				
	Bili	AP	OT	PT	GT	Bili	AP	OT	PT	GT	Bili	AP	OT	PT	GT
160	3,42	161	16	30	26	3,42	69	7	18	53	-	-	-	-	-
161	5,13	114	9	21	14	3,42	43	10	20	42	1,71	51	8	15	29
164	3,42	107	9	16	58	3,42	80	10	17	22	3,42	79	9	10	14
165	8,55	219	26	21	25	3,42	169	11	18	52	3,42	141	16	18	23
166	3,42	158	10	19	41	1,71	58	16	10	25	1,71	47	10	5	21
167	1,71	114	15	21	55	3,42	87	17	25	103	3,42	80	11	12	2
169	3,42	87	16	48	36	3,42	94	13	36	30	-	-	-	-	-
172	8,55	52	29	31	25	1,71	195	16	21	24	-	-	-	-	-
$\bar{x}_{160-172}$ + _s	5,13 2,56	126 51	16 7,6	26 10	35 15	2,90 0,68	99 54	12 3,6	21 7,5	44 27	-	-	-	-	-
$\bar{x}_{161-167}$ + _s	4,44 2,59	142 47	14 7	19,6 2	38,6 19	3,07 0,76	87 48	13 3	18 5,4	49 33	2,73 0,93	79 37	11 3	12 5	18 10
176	6,84	209	23	24	28	1,71	129	6	18	83	-	-	-	-	-
183	5,13	109	12	25	15	3,42	128	11	29	25	-	-	-	-	-
186	5,13	148	11	23	33	3,42	43	9	25	55	-	-	-	-	-
$\bar{x}_{176-186}$ + _s	5,13 0,85	155 50	12 1	24 1	25 9	2,73 0,85	100 44	8,6 2,5	24 5,5	54 29	-	-	-	-	-

Tabelle 12 Na^+ , K^+ , Ca^{++}

(Na: mg/100 ml x 1 = mmol/l

K: mg/100 ml x 1 = mmol/l

Ca: mg/100 ml x 0,249 = mmol/l)

Einheiten: mmol/l

Versuchs- tier-Nr.	vor Fütterung			nach Fütterung			nach Fettfütt.		
	Na	K	Ca	Na	K	Ca	Na	K	Ca
160	139	4,0	2,6	134	4,1	2,5	-	-	-
161	144	4,3	2,4	134	3,9	2,4	137	3,2	2,0
164	142	4,3	2,5	142	4,4	2,5	140	4,3	2,5
165	137	3,6	2,4	142	4,3	2,6	140	4,0	2,5
166	146	4,4	2,6	143	3,9	2,4	139	3,5	2,4
167	142	3,5	2,3	139	4,4	2,6	140	4,1	2,3
169	141	3,8	2,5	143	4,1	2,3	-	-	-
172	138	3,6	2,3	133	4,1	2,2	-	-	-
$\bar{x}_{160-172}$ $\pm s$	141 3	3,9 0,35	2,5 0,09	139 4,4	4,1 0,2	2,4 0,12	- -	- -	- -
$\bar{x}_{161-167}$ $\pm s$	142 3,0	4,0 0,4	2,4 0,11	140 3,6	4,2 0,25	2,5 0,1	139 1,3	3,8 0,45	2,3 0,20
176	141	3,9	2,5	142	4,5	2,6	-	-	-
183	142	3,7	2,5	140	4,5	2,5	-	-	-
186	137	3,9	2,4	137	3,6	2,3	-	-	-
$\bar{x}_{176-186}$ $\pm s$	140 2,6	3,8 0,14	2,5 0,06	140 2,5	3,9 0,5	2,5 0,14	- -	- -	- -

(im Zeitraum vom 20.2.1976 bis 3.6.1977). Die Tiere waren nicht vorbehandelt und standen noch in keinem Versuchsprogramm. Es handelte sich ausschließlich um Blutentnahmen nach der Verlegung des Vena-cava-Katheters. Die Werte waren:

Gesamteiweiß: $73.8 \pm 3,9$ g/l

Albumin : $0,42 \pm 0,04$ Teile von 1

α -Bereich : $0,20 \pm 0,02$ Teile von 1

$\beta\gamma$ -Bereich : $0,38 \pm 0,04$ Teile von 1

Ein typisches Elektropherogramm, das diesen Werten entspricht, ist in Abbildung 11 dargestellt.

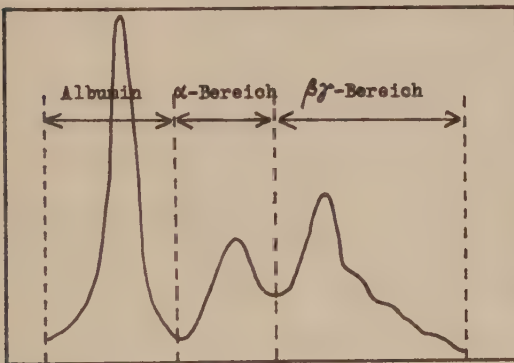


Abb.11 Typisches Elektropherogramm beim Miniaturschwein (Versuchstier Nr.161)

Die Gesamteiweißwerte unserer Versuchstiere stimmten vor der Fütterungsperiode sehr gut mit dem ermittelten Normalwert überein. Nach der Versuchszeit von 10 Tagen näherte sich eher noch der Gesamteiweißwert der Kontrolltiere ($77,3 \pm 7,5$ g/l) dem Normalwert als der Wert der Medikamententiere ($82,0 \pm 10,9$ g/l); statistisch sichern ließ sich die Zunahme jedoch nicht. Albumin, α - und $\beta\gamma$ -Bereich in der Kontrollgruppe ent=

sprachen auch nach der Versuchsperiode noch sehr gut den ermittelten Normalwerten (Tab.13). Bei den Medikamententieren war der Albuminanteil eher erniedrigt ($0,36 \pm 0,05$ Teile von 1), während der α -Bereich sich noch im Normbereich befand; dagegen war der $\beta\gamma$ -Bereich bei über 60 % der Tiere erhöht ($0,43 \pm 0,03$ Teile von 1). In diesen Fällen war immer auch das Gesamteiweiß deutlich angestiegen. Die Zunahme im $\beta\gamma$ -Bereich bei den Medikamententieren war signifikant ($p < 0,05$).

3.3.2 Hämorheologische Befunde

Die Ausgangswerte des Hämatokrits waren in beiden Versuchsgruppen fast gleich (Tab.14). Der geringe Anstieg bis zum 7.Tag war im Mittelwert in beiden Gruppen erkennbar: während der Unterschied bei den Medikamententieren statistisch nicht zu sichern war, handelte es sich bei den Kontrolltieren um eine signifikante Hämatokritzunahme ($p < 0,05$). Bis zum 10.Tag des Versuches nahm der Hämatokrit bei beiden Tiergruppen wieder ab, der Abfall bei den Medikamententieren war signifikant ($p < 0,01$).

Die Fibrinogenkonzentrationen verhielten sich in beiden Versuchsgruppen uncharakteristisch (Tab.15).

Auch die Bestimmung der Blut- und Plasmaviskosität ließ keine statistisch zu sichernden Unterschiede erkennen, wenngleich eine Abnahme der Blutviskosi-

Tabelle 13 Gesamt-Eiweiß, Eiweißfraktionen

(Ges.-Eiweiß: g/100 ml x 10 = g/l
Fraktionen: % x 0,01 = Teil der "Einheit 1")

Einheiten: Gesamt-eiweiß: g/l

Fraktionen : Teil der "Einheit 1"

Versuchs- tier-Nr.	vor Fütterung			nach Fütterung			nach Fettfütterung					
	Ges.-E.	Alb.	α -B.	β/γ -B.	Ges.-E.	Alb.	α -B.	β/γ -B.	Ges.-E.	Alb.	α -B.	β/γ -B.
160	-	-	-	-	87,5	0,312	0,205	0,483	-	-	-	-
161	74,0	0,397	0,209	0,380	93,0	0,309	0,180	0,510	78,0	0,331	0,183	0,485
164	74,5	0,394	0,247	0,359	72,0	0,445	0,216	0,339	79,0	0,474	0,173	0,353
165	67,0	0,375	0,278	0,347	78,0	0,377	0,244	0,379	77,0	0,499	0,159	0,342
166	70,0	0,415	0,270	0,315	100,0	0,311	0,225	0,464	93,0	0,209	0,174	0,617
167	75,0	0,381	0,219	0,400	79,0	0,401	0,200	0,399	76,6	0,378	0,195	0,427
169	76,5	0,332	0,235	0,433	70,0	0,339	0,168	0,493	-	-	-	-
172	67,5	0,428	0,152	0,420	82,2	0,341	0,196	0,465	-	-	-	-
$\bar{x}_{161-172}$	72,0	0,388	0,230	0,379	82,0	0,360	0,205	0,435	-	-	-	-
$\pm_{-g}$	3,8	0,031	0,042	0,042	10,9	0,049	0,026	0,063	-	-	-	-
$\bar{x}_{161-167}$	72,1	0,392	0,244	0,360	84,4	0,368	0,213	0,418	80,7	0,378	0,177	0,444
$\pm_{-g}$	3,4	0,015	0,003	0,037	11,6	0,054	0,024	0,068	6,9	0,116	0,013	0,112
176	74,1	0,399	0,200	0,400	72,0	0,464	0,185	0,374	-	-	-	-
185	70,0	0,409	0,205	0,378	74,0	0,446	0,191	0,347	-	-	-	-
186	75,0	0,409	0,202	0,389	86,0	0,384	0,190	0,426	-	-	-	-
$\bar{x}_{176-186}$	73,0	0,405	0,202	0,389	77,3	0,431	0,188	0,374	-	-	-	-
$\pm_{-g}$	2,6	0,005	0,002	0,011	7,5	0,042	0,003	0,044	-	-	-	-

Tabelle 14 Hämatokrit

(Vol% x 0,01 = Teil der "Einheit 1")

Einheit: Teil der "Einheit 1"

Versuchs- tier-Nr.	vor Fütterung	am 7. Tag der Fütterungszeit	nach Fütterung	nach Fettfütterung
160	0,335	0,333	0,353	-
161	0,331	0,324	0,301	0,325
164	0,374	0,349	0,360	0,358
165	0,386	0,387	0,356	0,347
166	0,405	0,350	0,300	0,320
167	0,256	0,368	0,340	0,296
169	0,321	0,350	0,290	-
172	0,345	0,343	0,370	-
$\bar{x}_{160-172}$	0,344	0,350	0,334	-
$\pm_s$	0,046	0,019	0,031	-
$\bar{x}_{161-167}$	0,350	0,355	0,331	0,329
$\pm_s$	0,059	0,023	0,029	0,024
176	0,370	0,380	0,346	-
183	0,360	0,380	0,400	-
186	0,320	0,340	0,330	-
$\bar{x}_{176-186}$	0,350	0,366	0,358	-
$\pm_s$	0,026	0,023	0,036	-

Tabelle 15 Fibrinogen

(mg/100 ml x 0,01 = g/l)

Einheit: g/l

Versuchs- tier-Nr.	vor Fütterung	am 7. Tag der Fütterungszeit	nach Fütterung	nach Fettfütterung
160	3,56	3,94	6,60	-
161	4,35	3,68	4,10	3,02
164	6,60	5,50	3,45	4,10
165	6,60	6,60	4,55	3,90
166	3,45	6,60	6,60	6,60
167	6,60	4,40	5,44	6,60
169	4,14	4,50	2,63	-
172	6,60	6,60	6,60	-
$\bar{x}_{160-172}$ $\pm s$	5,23 1,48	5,22 1,25	4,99 1,55	- -
$\bar{x}_{161-167}$ $\pm s$	5,52 1,51	5,35 1,30	4,82 1,22	4,84 1,65
176	4,11	4,28	3,84	-
183	6,10	4,50	1,77	-
186	6,60	5,80	6,60	-
$\bar{x}_{176-186}$ $\pm s$	5,60 1,31	4,86 0,82	4,07 2,42	- -

tät, besonders bei hohem Schergrad, in beiden Versuchsgruppen vorhanden war (Tab.16). Die Viskosität des Plasmas tendierte bei allen Tieren zu einer geringen Zunahme, wobei vor allem in der Medikamentengruppe die Fließfähigkeit des Plasmas bei niedrigem Schergrad betroffen war.

Bei der Prüfung der Erythrozytenflexibilität bzw. der Filtrierbarkeit durch Microporefilter (Tab.17) war die Zunahme der Verformbarkeit der Erythrozyten bei den Medikamententieren signifikant ($p < 0,05$).

3.3.3 Plättchenteste

Im Mittel war in beiden Versuchsgruppen bis zum 7.Tag der Versuchsperiode eine Zunahme der Thrombozytenzahlen, bis zum 10.Tag eine Abnahme bis unter den Ausgangswert festzustellen. Der Unterschied war jeweils statistisch nicht zu sichern (Tab.18).

Bei der Testung der Plättchenaggregation nach PAT I zeigte sich eine allgemein höhere Aggregationstendenz vor Versuchsbeginn bei den Medikamententieren. Während der PAT bei den Medikamententieren im Mittelwert um 0,20 abnahm, stieg er bei den Kontrolltieren um 0,90 an (Tab.19). Der Unterschied (PAT-Abnahme bei den Medikamententieren bzw. PAT-Zunahme bei den Kontrolltieren) nach 7 und 10 Tagen war nicht signifikant. Deutlicher war die Zunahme der Aggregationstendenz bei den Kontrolltieren bei der Errechnung der Faktoren: nach der Versuchsperiode

Tabell 16 Viskosität von Blut und Plasma (bei 6
bzw. 60 Umdrehungen pro Minute)

Einheit: cp

a) Blut - Viskosität

Versuchs- tier-Nr.	vor Fütterung		am 7. Tag d. Fütterung		am 10. Tag d. Fütterung		nach Fett- fütterung	
	60	6	60	6	60	6	60	6
160	5,25	10,52	4,55	10,00	6,65	11,05	-	-
161	4,20	16,84	4,20	10,50	4,16	13,01	-	-
164	5,08	14,74	4,03	10,42	4,03	10,53	-	-
165	6,30	21,01	4,38	14,70	4,20	10,42	3,78	1,40
166	4,97	14,70	4,90	11,80	5,25	12,00	-	-
167	4,38	12,50	4,20	12,80	4,20	12,60	3,68	11,90
169	5,08	10,42	3,85	8,30	2,98	8,21	-	-
172	4,15	14,31	5,25	17,60	5,25	20,00	-	-
$\bar{x}_{160-172}$ $\pm_s$	4,92 0,70	14,38 3,47	4,42 0,46	12,01 2,97	4,58 1,10	12,23 3,48	-	-
176	4,30	12,43	3,85	12,42	4,73	10,68	-	-
183	5,08	10,25	4,38	9,30	4,20	8,40	-	-
186	5,60	16,84	5,25	20,05	4,90	18,95	-	-
$\bar{x}_{176-186}$ $\pm_s$	4,99 0,65	13,17 3,35	4,49 0,70	13,92 5,53	4,61 0,36	12,67 5,55	-	-

b) Plasma - Viskosität

Versuchs- tier-Nr.	vor Fütterung		am 7. Tag d. Fütterung		am 10. Tag d. Fütterung		nach Fett- fütterung	
	60	6	60	6	60	6	60	6
160	2,54	4,53	1,93	4,21	3,15	6,76	-	-
161	2,10	4,21	1,93	4,21	1,92	4,21	-	-
164	1,10	4,30	1,93	5,26	1,84	4,21	-	-
165	1,93	4,21	2,10	4,21	2,10	6,32	1,93	6,52
166	1,89	6,20	2,03	5,10	4,73	16,80	-	-
167	3,33	12,60	1,65	11,40	2,28	13,10	1,93	2,95
169	2,28	4,21	2,63	4,21	1,58	2,10	-	-
172	1,40	1,70	2,10	4,21	2,80	8,24	-	-
$\bar{x}_{160-172}$ $\pm_s$	2,07 0,68	5,24 3,20	2,03 0,28	5,30 2,50	2,55 1,02	7,70 4,90	-	-
176	2,00	5,33	2,10	5,21	2,45	5,10	-	-
183	2,98	4,70	2,43	4,21	1,85	5,21	-	-
186	1,92	6,21	2,10	5,53	3,50	6,32	-	-
$\bar{x}_{176-186}$ $\pm_s$	2,30 0,59	5,41 0,75	2,21 0,19	4,98 0,68	2,60 0,83	5,54 0,67	-	-

Tabelle 17 Erythrozytenflexibilität

Einheit: "ml auf 1 Minute"

Versuchs- tier-Nr.	vor Fütterung	am 7. Tag d. Fütterung	am 10. Tag d. Fütterung	nach Fett- fütterung
160	1,037	1,070	1,700	-
161	1,090	0,740	1,120	1,340
164	1,180	1,279	3,730	1,528
165	0,550	1,180	1,800	2,370
166	2,140	1,050	1,550	1,200
167	0,760	0,750	1,600	0,970
169	1,200	0,630	2,308	-
172	1,100	0,760	1,600	-
$\bar{x}_{160-172}$	1,130	0,932	1,926	-
$\pm s$	0,46	0,24	0,79	-
$\bar{x}_{161-167}$	1,144	0,999	1,960	1,482
$\pm s$	0,611	0,24	1,02	0,53
176	0,800	0,750	1,000	-
183	0,880	1,180	0,990	-
186	1,500	1,400	0,980	-
$\bar{x}_{176-186}$	1,060	1,110	0,990	-
$\pm s$	0,38	0,33	0,01	-

Tabelle 18 Thrombozyten

(Zahl/mm³ x 0,001 = G/l)

Einheit: G/l

Versuchs- tier-Nr.	vor Fütterung	am 7. Tag d. Fütterung	nach Fütterung	nach Fett- fütterung
160	427,0	480,0	683,0	-
161	505,6	613,5	382,0	-
164	358,5	455,0	448,0	452,0
165	462,0	632,0	529,0	517,5
166	358,0	335,5	343,5	151,0
167	359,0	355,0	404,0	614,0
169	435,0	581,0	400,0	-
172	591,0	382,0	189,0	-
$\bar{x}_{160-172}$	473,0	501,7	422,2	-
$\pm_s$	82,5	107,8	143,0	-
$\bar{x}_{164-167}$	384,4	444,4	431,1	433,6
$\pm_s$	51,7	135,6	78,0	199,8
176	439,0	358,0	424,0	-
183	365,0	504,0	408,0	-
186	484,5	626,0	281,0	-
$\bar{x}_{176-186}$	429,5	496,0	371,0	-
$\pm_s$	60,0	134,1	78,3	-

Tabelle 19 PAT I

Einheiten: Stufen, Faktoren (siehe 2.6)

a) Stufen

Versuchs- tier-Nr.	vor Fütterung	am 7. Tag d. Fütterung	nach Fütterung	nach Fett- fütterung
160	2,00	2,50	2,50	-
161	2,50	2,00	1,25	2,50
164	1,25	2,25	2,00	2,25
165	1,25	1,50	1,75	2,75
166	1,50	1,75	1,75	1,25
167	2,50	1,50	2,50	1,75
169	2,50	2,75	2,00	-
172	2,50	1,50	1,25	-
$\bar{x}$ 160-172	2,00	1,90	1,80	-
$\pm_s$	0,58	0,50	0,50	-
$\bar{x}$ 161-167	1,80	1,80	1,85	2,10
$\pm_s$	0,64	0,32	0,45	0,60
176	1,50	3,00	3,50	-
183	1,50	2,50	3,00	-
186	2,00	1,50	1,50	-
$\bar{x}$ 176-186	1,66	2,30	2,60	-
$\pm_s$	0,30	0,70	1,00	-

b) Faktoren

Versuchs- tier-Nr.	vor Fütterung	am 7. Tag d. Fütterung	nach Fütterung	nach Fett- fütterung
160	1,300	1,350	2,321	-
161	2,090	1,125	0,227	2,320
164	0,375	2,050	1,786	2,023
165	0,833	1,240	1,220	2,580
166	1,770	2,250	2,345	0,339
167	3,050	0,440	4,400	2,360
169	3,750	3,250	3,800	-
172	4,460	2,300	0,820	-
$\bar{x}$ 160-172	2,200	1,750	2,100	-
$\pm_s$	1,4	0,87	1,4	-
$\bar{x}$ 161-167	1,623	1,421	1,995	1,924
$\pm_s$	1,055	0,735	1,555	0,908
176	0,533	9,300	10,000	-
183	0,417	3,630	8,650	-
186	1,300	0,730	1,130	-
$\bar{x}$ 176-196	0,750	4,500	6,600	-
$\pm_s$	0,5	4,3	4,7	-

waren die Faktoren signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Die Prüfung der Plättchenadhäsivität mit dem Faser-test war, wie schon erwähnt, mit Schwierigkeiten verbunden. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 20 ersichtlich. Bemerkenswert war, daß bei einem mit dem Medikament behandelten Tier am 7. und am 10. Tag der Wert zwei Stunden nach Futtergabe nicht höher war als der Nüchternwert.

3.4 Subaquale Blutungszeit

Die Bestimmung der subaqualen Blutungszeit wurde, um Normalwerte zu gewinnen, auch bei anderen Tieren vor der Verlegung eines Vena-cava-Katheters durchgeführt: der Mittelwert lag bei 120 ± 21 s; die Methode war unter den gewählten Bedingungen sehr gut reproduzierbar. Diesem Mittelwert entsprachen auch die Blutungszeiten der Medikamententiere vor Versuchsbeginn, sowie die Zeiten der Kontrolltiere vor und nach der Fütterungsperiode. Die Medikamententiere bluteten signifikant länger als die Kontrolltiere (Tab.21; $p < 0,05$).

3.5 Rasterelektronenmikroskopische Befunde

Gemäß der Bewertungsskala (Seite 27) wurden die Aufnahmen vom Arterienendothel nach Eisreiz bezüglich der Beobachtungspunkte "Thrombozyten" und "Endothel" blind bewertet. Vor der Versuchsperiode war die Benotung in beiden Tiergruppen beinahe identisch

Tabelle 20 Fasertest

Einheit: μg Plättchenprotein

Versuchs- tier-Nr.	vor Fütterung	am 7. Tag d. Fütterung	nach Fütterung	nach Fett- fütterung
160	20,91	19,11	-	-
161	12,50	-	13,79	13,01
164	12,06	-	-	-
165	-	-	-	-
166	22,75	18,27	23,76	-
167	36,36	21,56	20,29	19,88
169	25,56	21,72	21,89	-
172	-	23,80 1)	21,80 2)	-
176	26,10	-	21,9	-
183	25,58	23,29	24,30	-
186	22,55	23,04	-	-

1) 2 Std. postprandial: 23,70 μg

2) 2 Std. postprandial: 21,90 μg

Tabelle 21 Subaquale Blutungszeit

Einheit: Sekunden

Versuchs- tier-Nr.	vor Fütterung = 1. OP	nach Fütterung = 2. OP	nach Fett- fütterung = 3. OP
160	-	-	-
161	-	-	-
164	125	160	440
165	112	170	315
166	102	225	128
167	132	445	465
169	155	260	-
172	90	200	-
$\bar{x}_{164-172}$ $\pm_s$	119,3 23,1	243,3 105,3	- -
$\bar{x}_{164, 165, 167}$ $\pm_s$	123,0 10,1	258,3 161,7	406,6 80,4
176	110	100	-
183	125	130	-
186	-	-	-
$\bar{x}_{176, 183}$ $\pm_s$	117,5	115,0	-

Tabelle 22 Rasterelektronenmikroskopische Befunde:

Thrombozyten

Einheit: Noten 1 - 6 (siehe 2.7)

Erläuterung: c. = a.carotis
 f. = a.femoralis
 ria. = r.interventricularis
 anterior a.coronariae sin.
 o. = a.abdominalis über
 Nierenarterienabgang
 u. = a.abdominalis unter
 Nierenarterienabgang

Versuchs= tier-Nr.	vor Fütterung = 1. Op		nach Fütterung = 2. Op			nach Fettfütterung = 3. Op		
Gefäße	c.	f.	c.	f.	ria.	ria.	o.	u.
160	5	4	3	2	-	-	-	-
161	5	5	2	2	-	3	-	-
164	5	4	3	2	-	5	5	6
165	4	5	2	2	-	4	5	
166	5	5	3	2	-	5	-	-
167	5	5	2	2	-	4	5	
169	4	5	2	2	2	-	-	-
172	5	5	3	2	2	-	-	-
$\bar{x}_{160-172}$ $\pm s$	4,7 0,4		2,2 0,4			- -		
$\bar{x}_{161-167}$ $\pm s$	4,8 0,4		2,2 0,4			4,6 0,8		
176	4	5	5	4	5	-	-	-
183	5	4	4	5	5	-	-	-
186	5	4	4	5	5	-	-	-
$\bar{x}_{176-186}$ $\pm s$	4,5 0,5		4,6 0,5			- -		

Tabelle 23 Rasterelektronenmikroskopische Befunde:

Gefäßendothel

Einheit: Noten 1 - 6 (siehe 2,7)

Erläuterung: c. = a.carotis
 f. = a.femoralis
 ria. = r.interventricularis
 anterior a.coronariae sin
 o. = a.abdominalis über
 Nierenarterienabgang
 u. = a.abdominalis unter
 Nierenarterienabgang

Versuchs= tier-Nr.	vor Fütterung = 1. Op		nach Fütterung = 2. Op			nach Fettfütterung = 3. Op		
Gefäße	c.	f.	c.	f.	ria.	ria.	o.	u.
160	3	2	4	2	-	-	-	-
161	3	4	3	3	-	3	-	-
164	3	2	2	3	-	2	3	4
165	3	3	3	2	-	3	4	
166	2	3	3	2	-	3	-	-
167	4	3	3	3	-	3	4	
169	2	3	3	2	2	-	-	-
172	2	3	3	2	2	-	-	-
$\bar{x}_{160-172}$	2,8		2,6			-		
$\pm s$	0,6		0,6			-		
$\bar{x}_{161-167}$	3,0		2,7			3,2		
$\pm s$	0,6		0,5			0,6		
176	3	3	3	4	2	-	-	-
183	4	2	2	3	2	-	-	-
186	2	2	3	2	2	-	-	-
$\bar{x}_{176-186}$	2,6		2,5			-		
$\pm s$	0,8		0,7			-		

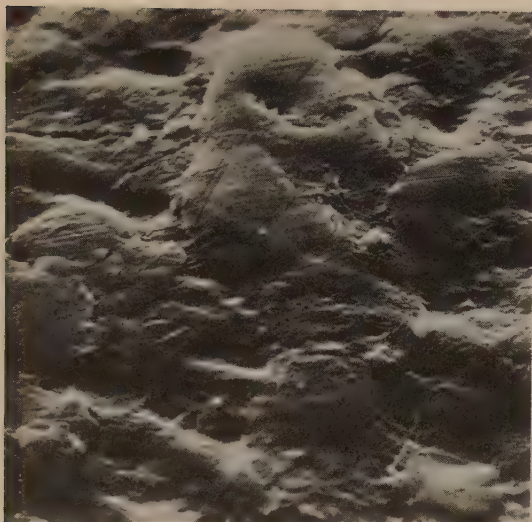
(Tab.22). Während sich die Notenstufe bezüglich der Thrombozytenadhäsion bei den Medikamententieren nach 10 Tagen signifikant ($p < 0,01$) erniedrigt hatte-im Sinne einer verminderten Adhäsion- blieb bei den Kontrolltieren der Ausgangswert erhalten.

Bei der Beurteilung des Gefäßendothels war die Benotung vor Versuchsbeginn und am Ende der Versuchsperiode etwa gleich (Tab.23).

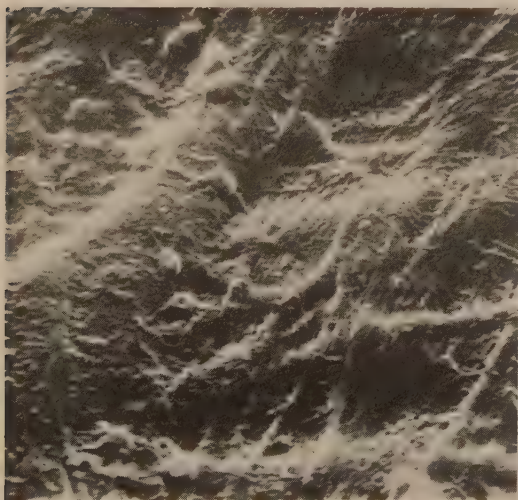
Die nachfolgenden Bilder zeigen einige Kriterien der Benotung.



Rem Bild 1: Weitgehend normales Innenrelief einer a.carotis; die Leisten entsprechen vmtl. der tunica elastica int.; auch einige monozytäre Elemente.
(rem Vergrößerung 930:1, Arch.Nr.44830)



Rem Bild 2: a.femoralis nach Eisreiz vor Medikamenten-
gabe; Endothelgefügestörung, nur vereinzelt
Thrombozyten adhären.
(rem Vergrößerung 2450:1, Arch.Nr.44967)



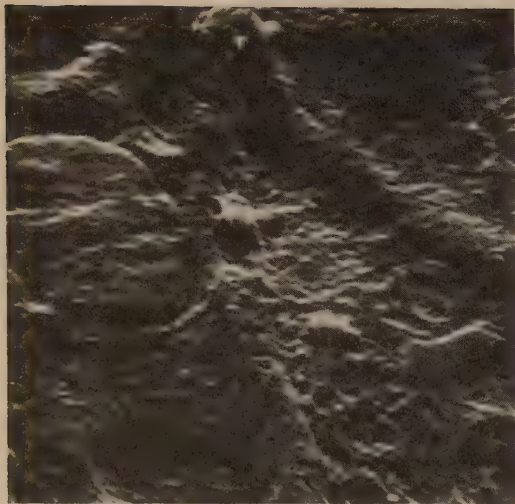
Rem Bild 3: a.femoralis nach Eisreiz vor Medikamenten-
gabe; mehrere typ. Thrombozyten mit kurzen
Pseudopodien; verändertes Endothel; mög-
licherweise auch Fibrinauflagerungen.
(rem Vergrößerung 3000:1, Arch.Nr 46053)



Rem Bild 4: a.femoralis nach Eisreiz vor Medikamenten=gabe; auf etwas strukturveränderter Innen=fläche mehrere Thrombozyten.
(rem Vergrößerung 1500:1, Arch.Nr.45422)



Rem Bild 5: a.carotis nach Eisreiz vor Medikamenten=gabe; zahlreiche aufgeworfene Endothel=zellen und Thrombozyten.
(rem Vergrößerung 5000:1, Arch.Nr.45738)



Rem Bild 6: a.carotis nach Eisreiz nach Medikamenten=gabe; deutliche Abgrenzung einer Endothel=zelle; zwei typ. Thrombozyten.
(rem Vergrößerung 5000:1, Arch.Nr.44933)



Rem Bild 7: a.femoralis nach Eisreiz nach Medikamenten=gabe; weitgehend unauffälliges Endothel (Schrumpfungsartefakte); mögl. zwei mono=zytäre Elemente.
(rem Vergrößerung 1800:1, Arch.Nr.46171)



Rem Bild 8: r.interventricularis ant. a.coronariae sin.
nach Fettfütterung und nach Eisreiz; am
Rande eines Endothelzellkraters mehrere mono-
zytäre Elemente; einige Thrombozyten; weit-
gehend normales Endothel (1 Erythrozyt).
(rem Vergrößerung 2300:1, Arch.Nr.45661)
(Vitalfixierung)



Rem Bild 9: r.interventricularis ant. a.coronariae sin.
nach Fettfütterung und nach Eisreiz; einige
monozytäre Elemente auf oberflächlich weit-
gehend intaktem Endothel (2 Erythrozyten).
(rem Vergrößerung 1900:1, Arch.Nr.45658)
(Vitalfixierung)

4. Diskussion

4.1 Arteriellcs Thrombosemodell

Das Hauptanliegen dieser Untersuchung war die Entwicklung eines möglichst "physiologischen" arteriellen Thrombosemodells.

Der Vorteil des hier aufgezeigten Thrombosemodells war die optimale Nachahmung einer rein arteriellen Thrombose unter möglichst physiologischen In-vivo-Bedingungen. Dabei war dieses Modell einer gewissen Standardisierung (Eistemperatur, Reizdauer) zugänglich und nach den bisherigen Erfahrungen ausreichend reproduzierbar sowie vor allem in kürzester Zeit zu erzeugen. Ein weiterer Vorteil bestand darin, daß jeweils die kontralaterale Seite zum intra-individuellen Vergleich herangezogen werden konnte. Die Vorteile des Miniaturschweins für die vergleichende experimentelle Medizin sind vielfach erwiesen (40).

Entscheidender Nachteil war der vergleichsweise hohe Aufwand bezüglich des Experiments und der Auswertung. Auch haften einer morphologischen Beurteilung immer subjektive Momente an. Ebenso ließ sich nicht abgrenzen, inwieweit die Narkose das Versuchsergebnis beeinflusste. Zur Kritik muß auch angebracht werden, daß bezüglich der Standardisierung des Kältereizes das Modell noch verbesserungsfähig wäre (Temperaturkonstanz, tiefere Temperaturen nach Wahl, exakte Festlegung der Reizausdeh-

nung in Längsrichtung und zirkulär).

Das grundlegend Wichtige bei diesem Modell war jedoch die strenge Blindauswertung der rasterelektromikroskopischen Präparate und die Mitführung einer Kontrollgruppe. Wünschenswert ist auch immer die Bestimmung thrombosekorrelierter humoraler Parameter.

4.2 Prüfung der medikamentösen Beeinflußbarkeit dieses arteriellen Thrombosemodells

Nachdem dieses arterielle Thrombosemodell etabliert war, war es konsequenterweise ein weiteres Anliegen, die medikamentöse Beeinflußbarkeit dieses Modells zu prüfen. Für diese Prüfung stand uns eine neue Substanz, ein Mercaptooxacolyldcarbonsäurederivat (EMD 26644) zur Verfügung.

Aus verschiedenen Untersuchungen (Tierexperimente, klinische Erprobung an freiwilligen Probanden) ist die gute aggregationshemmende (PAT III, Blutungszeit) und adhäsionshemmende (Fasertest) Wirkung von EMD 26644 auf die Thrombozyten erwiesen (1, 11 a-n, 28,43) Durch die Blindauswertung der rem Bilder vor und nach der Versuchsperiode bei ein und demselben Tier sowie der nicht behandelten Kontrolltiere ließ sich zeigen, daß zum einem das Angiopathiemodell "Eisreiz" für die experimentelle Forschung funktions-tüchtig ist, zum anderen das Medikament EMD 26644 auch in vivo eine signifikante thrombozytenadhäsions- und aggregationshemmende Wirkung hat. Nach der Ver-

suchsperiode waren auf den Gefäßen der mit EMD 26644 gefütterten Tiere signifikant ($p < 0,01$) weniger Thrombozyten adhären als auf denen der Kontrolltiere. Sämtliche entnommenen Gefäße hatten entweder die Präparationsnoten 1 oder 2 (siehe Abb. 2 Seite 16), so daß operationsbedingte Thrombozytenadhäsionen weitgehend ausgeschlossen werden konnten.

Eine wesentliche Veränderung der Endotheloberfläche ließ sich auf den rem Bildern nicht erkennen. Um einen evtl. Endothelschutz-Effekt von EMD 26644 aufklären zu können, müßten neben Messungen von vermehrt im Blut auftretenden Endothelzellen (27) auch ergänzende transelektronenmikroskopische Gefäßwanduntersuchungen durchgeführt werden.

4.3 Tierbeobachtung und EMD 26644 - Serumspiegel

Während der Versuchsperiode hatten fast alle Tiere an Gewicht gewonnen, jeweils ein Tier blieb gewichtskonstant. Eine durch das Medikament bedingte schnelle Gewichtszunahme, evtl. auch in Form von Flüssigkeitseinlagerung, konnte daraus noch nicht abgeleitet werden; vor und nach der Versuchsperiode war ein statistischer Unterschied zwischen den Versuchsgruppen nicht zu sichern.

Bei unseren Versuchstieren war weder die bei anderen Versuchen (11k) beobachtete vermehrte Wasser- noch Futteraufnahme angestiegen, wobei einschränkend hinzugefügt werden muß, daß die Wasseraufnahme quantitativ nur grob beurteilt werden konnte. Im Gegen-

teil, bei drei Medikamententieren zeigte sich ab 6./7. Tag eine deutliche Futterabneigung (Tab.4). Diese Freßunlust muß wohl auf schwere gastro-intestinale Störungen zurückgeführt werden: es ist aus Fütterungsversuchen mit EMD 26644 an Mäusen, Ratten, Kaninchen und Hunden bekannt, daß besonders im Gastrointestinalbereich Ulzerationen auftreten, die auch bei intraperitonäaler Applikation vorkommen (11c,d). Unseren Beobachtungen zufolge mußten bei drei Medikamententieren erhebliche Appetitstörungen angenommen werden. Neben Übelkeit und Erbrechen war dieses Symptom auch immer wieder die häufigste Nebenwirkung in neueren Untersuchungen (1). Versuchstier Nr. 166 erkrankte schwer mit Fieber, Erbrechen und Durchfall. Wenngleich sich die Verschlechterung im Freßverhalten nicht signifikant von den Kontrolltieren unterschied, verdient diese Beobachtung doch Beachtung, da eine derartige Futterabneigung bisher bei anderen Schweinen auch nicht in der postoperativen Phase beobachtet worden war.

Obwohl aus verschiedenen Untersuchungen bekannt ist, daß die geringsten EMD 26644 - Konzentrationen bei den untersuchten Tierspezies (Mäuse, Ratten, Rhesusaffen) im Gehirn auftraten (11f,g) und daß keinerlei Nebenwirkungen hinsichtlich des zentralen Nervensystems zu erkennen waren (11h), konnte bei vier Medikamententieren eine deutliche Einschränkung des motorischen und affektiven Verhaltens beobachtet wer-

den, wobei die drei schlechter fressenden Tiere dazu gehörten. Eine Erklärung ist vermutlich in der höheren Dosierung der Testsubstanz oder in bisher nicht gemessenen nervenzellgängigen Metaboliten zu suchen.

Der auffälligste Unterschied zwischen Medikamenten- und Kontrolltieren bestand in der Heilungstendenz der bei der ersten Operation gesetzten Wunden. Kein Kontrolltier zeigte einen komplizierten postoperativen Verlauf, während sechs Tiere der Medikamentengruppe unter zum Teil erheblichen Störungen der Wundheilung litten. Bei keinen anderen Versuchen wurden in diesem Ausmaß Wundheilungsstörungen beobachtet; wieder war davon das Tier Nr. 166 am schwersten betroffen. Trotz der fehlenden statistischen Signifikanz erscheint das Wundheilungsverhalten sehr auffällig, sieht man es vor allem im Hinblick auf die zahlreichen an unserer Klinik schon durchgeführten derartigen Tieroperationen. Für die Ursachen dieser schlechten Wundheilung könnten zwei Möglichkeiten diskutiert werden. Auch bei den rasch zur nächsten Mitose sich vorbereitenden Zellen des Granulationsgewebes könnte der gleiche Schädigungsmechanismus wie bei der enteralen Schleimhaut vorliegen. Der Reparationsvorgang verläuft langsamer, die Infektionsgefahr ist schon aus diesem Grunde, gerade aber bei den hygienischen Verhältnissen im Tierstall, erhöht. Eine möglicherweise hinzukommende "schwach immunosuppressive Wirkung" (11a) des Me-

dikaments ließe eine Infektion und damit Heilungsstörungen noch wahrscheinlicher werden. Dazu kommt noch, daß eine zweite wichtige Nebenwirkung des EMD 26644 offenbar in Hautaffektionen toxisch-allergischer Genese besteht (1), die vom einfachen Pruritus mit Exanthem über das Stevens-Johnson-Syndrom bis zum Lyell-Syndrom reichen. Diese Nebenwirkung ist vermutlich im Gegensatz zu den gastrointestinalen Störungen nicht dosisabhängig. Bei einem Versuchstier aus der Medikamentengruppe, dem schwer erkrankten Tier Nr. 166, wurden am 10.Tag am Stamm und den Extremitäten kleine, kokardenförmige, exanthematöse Hauteffloreszenzen beobachtet.

Bei der Betrachtung der Serumspiegel des Medikaments ist zuerst die breite Streuung der Konzentrationen sowohl am 7. wie auch am 10.Tag der Fütterung auffällig (Tab.5). Dafür sind, bei gesicherter oraler Aufnahme bei jedem Tier, verschiedene Gründe maßgebend: die Resorptionsquoten bei den bisher untersuchten Tierspezies waren nach oraler Applikation sehr unterschiedlich, sie betrugen zwischen 70% und 100% (11g). Selbst bei intravenöser Verabreichung bestanden erhebliche interindividuelle Unterschiede. Bei Studien am Menschen lagen nach Einmaldosierung von 50 mg und 250 mg EMD 26644 per os die erreichten Maxima nach Normierung der Blutspiegel zwischen $0,53 \mu\text{g/ml}$ und $2,40 \mu\text{g/ml}$ (11m), so daß auch bei unseren Versuchstieren demnach eine interindividuell sehr unterschiedliche Resorptionsquote angenommen

werden kann.

Beigetragen zu den sehr unterschiedlichen Serumkonzentrationen hatte ganz sicher auch eine forcierte oder verzögerte Elimination. Beim Menschen wurden sehr lange Eliminationshalbwertszeiten zwischen 4 - 8 Tagen festgestellt (11i), während bei Tieren die Halbwertszeit generell wesentlich geringer sein soll (11m, 3); sie lag bei 4 - 9 Stunden. Das Hauptausscheidungsorgan war bei allen untersuchten Tieren und auch beim Menschen die Leber via Galle, während die renale Elimination bei einer Metabolisierungsrate von 5% praktisch keine Rolle spielte. Der angenommene enterohepatische Kreislauf für die Originalsubstanz konnte bei der Ratte und beim Menschen durch Cholestyraminversuche nachgewiesen werden (11g,i).

Die bereits angesprochene niedrige Metabolisierungsrate ergäbe einen dritten Grund für die großen Unterschiede der Serumkonzentrationen. Es ist denkbar, daß auch hier eine speziesbedingte höhere oder niedrigere Verstoffwechslung vorlag, die wiederum von Tier zu Tier recht schwanken dürfte.

Bei unseren Versuchen kam ferner hinzu, daß die Blutabnahmen zum Zeitpunkt des niedrigsten Serumspiegels, etwa 22 - 26 Stunden nach der letzten Dosisverabreichung, vorgenommen wurden. In dieser relativ langen Zeitspanne wirkte sich die Interaktion zwischen den Faktoren Resorption, Elimination und Metabolisierung gravierend aus.

Es ist in keinem Fall durch die untersuchten Serumspiegel eine Aussage über Resorption, Metabolisierung und Elimination möglich. Beachtung verdient jedenfalls die Frage nach einem Zusammenhang von Serumspiegel und Tierverhalten: Versuchstier Nr. 164 und 165, welche am 7. und 10. Tag die höchsten EMD-Spiegel hatten (siehe auch Abb. 8 Seite 35), waren die einzigen Tiere, welche weder eine Störung der Wundheilung, der motorischen Aktivität noch des Fresshaltens aufwiesen. Damit wird deutlich, daß nicht die absoluten Serumkonzentrationen für die genannten Störungen ausschlaggebend waren, sondern nicht bestimmte Faktoren wie Metabolisierung, Abwehrkraft, enterohepatischer Kreislauf, enterale Sezernierung und eine konzentrationsunabhängige Wirkung des Medikaments. Es ist ferner bekannt, daß nicht die Konzentrationen eines Arzneimittels im Blut, sondern in den Organen, möglicherweise der Durchfluß in Menge pro Zeiteinheit für toxische Wirkungen entscheidend ist.

4.4 Allgemeine und hämostatisch relevante humorale Parameter

Die Hämoglobinkonzentrationen und Erythrozytenzahlen nahmen nach den Versuchsperioden in beiden Tiergruppen durch die Blutabnahmen geringfügig ab. Ein Einfluß der Testsubstanz auf die Hämoglobin- und Erythrozytenproduktion konnte ausgeschlossen werden.

Die signifikante Leukozytenzunahme bei den von der Wundheilungsstörung betroffenen Tieren war ein deutlicher Hinweis auf die massiven Entzündungsvorgänge (siehe auch Abb.9 Seite 39). Ein direkter Einfluß des Medikaments lag wohl nicht vor. Die abnehmenden Leukozytenzahlen und die schon erwähnte Hautreaktion bei Tier Nr. 166 könnten jedoch Ausdruck einer Überempfindlichkeitsreaktion auf das Medikament gewesen sein.

Die Untersuchungen des Nüchtern-Blutzuckers ebenso wie die Bestimmung der Serumelektrolyte ließen keinen Einfluß des Medikaments erkennen. Die mäßig fallende Tendenz von Natrium und die leicht ansteigenden K^+ -Konzentrationen waren allenfalls als Kompensationsmechanismus nach der Phase des postoperativen Aldosteronismus zu verstehen (47).

Ein cholesterin- oder triglyceridsenkender Effekt durch EMD 26644 (vergl.11h) konnte in unseren Untersuchungen nicht gefunden werden. Die mit Fettfuttermisch und 40 mg Medikament täglich gefütterten Tiere zeigten eine signifikante Zunahme des Cholesterinspiegels, während sich die Triglyceride, wohl leicht ansteigend, statistisch unauffällig verhielten.

Das Verhalten des Cholesterinspiegels entsprach auch den Ergebnissen einer Studie über diätetisch induzierte Hypercholesterinämie beim Miniaturschwein (37). Nach einer Woche war bei den dort untersuchten und mit dem gleichen Fettfuttermisch gefütterten

Tieren das Plasmacholesterin um etwa 150% gestiegen, noch deutlicher war der Anstieg der β -Lipoproteine. In unserem Versuch stieg Cholesterin nur um 120% an, β -Lipoproteine wurden nicht gemessen. Es war somit immerhin ein geringerer Cholesterinanstieg unter EMD 26644 zu erkennen. Die Wirkung auf die atherogenen β -Lipoproteine konnte aus diesem Versuch nicht bestimmt werden, wäre jedoch einer Untersuchung wert, zumal auffiel, daß der Anstieg des Cholesterinspiegels um so niedriger war, je mehr das Versuchstier an Dosis pro kg Körpergewicht erhielt.

Der signifikant höhere Plasmaharnstoff nach der Versuchsperiode bei den Medikamententieren bei unveränderten Kreatininwerten ließ ein vermindertes Glomerulumfiltrat weniger in Frage kommen, so daß eher ein erhöhter Proteinabbau zu der Harnstoff-N-Erhöhung beitrug. Diese Harnstoff-N-Erhöhung war auch bei Langzeitversuchen beobachtet worden (11h). Inwieweit dieser Effekt aber direkter Medikamenteneinfluß war, ließ sich nicht abschätzen; immerhin hatten die Versuchstiere Nr.164 und 165 mit den höchsten EMD-Spiegeln auch den steilsten Harnstoff-N-Anstieg (siehe auch Abb.10 Seite 44).

Hier ist auch eine katabolische Beeinflussung des Proteinstoffwechsels durch Thyroxin zu diskutieren, da bei Tierversuchen mit Ratten eine Stimulation der Schilddrüse beobachtet worden war (11e). Aller-

dings fehlten in unserem Versuch andere Hinweise auf eine Thyreoidea-Überfunktion, wie erhöhter Ca^{++} -Spiegel oder eine Cholesterinsenkung. Ein Harnstoff-N-Anstieg im Serum ist auch als Nebenwirkung einer langfristigen Behandlung mit Acetylsalicylsäure bekannt.

Die in Langzeitversuchen mit EMD 26644 bei verschiedenen Spezies festgestellte toxische Leberschädigung mit Transaminasenerhöhung, Lebervergrößerung und Leberzellnekrosen (1, 11e) konnte in diesem Tierexperiment wenigstens laborchemisch nicht bestätigt werden. Bei den genannten Studien handelte es sich durchwegs um Versuche mit höchsten EMD-Dosen bzw. um Langzeitversuche. Bei den in beiden Tiergruppen beobachteten Gamma-GT-Zunahmen handelte es sich vermutlich um Folgen der postoperativen Situation. Auch Hinweise auf eine Syntheseminderleistung durch eine abnehmende Albuminfraktion (Tab. 13) oder Senkung des Fibrinogenspiegels (Tab. 15) bestanden nicht. Die Harnstoff-N-Erhöhung war ein indirekter Indikator für eine stoffwechselaktive Leber. Eher sprachen das erniedrigte Bilirubin und die abnehmende alkalische Phosphatase für eine günstige Beeinflussung der Enzymaktivitäten in der Leber postoperativ, ohne daß ein gesonderter Effekt von EMD 26644, dessen höchste Organkonzentrationen in der Leber gemessen wurden (11f), beobachtet werden konnte.

Die nach der Versuchsperiode deutliche Erhöhung des

Plasmaeiweißes bei den Medikamententieren war hauptsächlich durch die Vermehrung im β/γ -Bereich bedingt (Tab.13). In den Elektropherogrammen der unter der schlechten Wundheilung leidenden Tiere war eindeutig eine Infektdysproteinämie zu erkennen. Die statistisch signifikante Zunahme des β/γ -Bereichs sprach dafür. Auch die im Magen-Darm-Trakt angenommenen Schleimhautläsionen könnten bei der Dysproteinämie im Sinne einer exsudativen Enteropathie mitgewirkt haben.

Zur Bestimmung des Einflusses von EMD 26644 auf die Fließeigenschaften des Blutes wurden der Hämatokrit, Fibrinogen und die Erythrozytenflexibilität ermittelt, sowie als globaler Test die Untersuchung der Viskosität von Blut und Plasma durchgeführt. Die Viskosität des Blutes ist von größter Wichtigkeit für die Durchblutung; aus der Hagen-Poiseuille'schen Formel ($\frac{V}{t} = \frac{\pi \Delta p r^4}{8 \eta l}$) wird deutlich, daß das Stromzeitvolumen ($\frac{V}{t}$) um so mehr vom Viskositätszustand (η) des Blutes abhängt, je kleiner der Gefäßradius (r) ist. Da die Kapillaren aber kein durchgängiges System zur Weitenänderung haben, sind Viskositätsänderungen für die Durchblutungsregulation im Bereich der Endstrombahn entscheidend (24). Änderungen des Hämatokrits (22, 53), des Stromzeitvolumens, des Aggregations- bzw. Desaggregationszustandes der Erythrozyten (9, 51), der Verformbarkeit der Erythrozyten (8), der Plasmaviskosität (Makromoleküle) und der Thrombozytenfunktionen (23) sind

die Mechanismen zur Variation der Blutviskosität.

In unserem Versuch nahm die Blutviskosität während der Versuchsperiode ab, die Differenz war jedoch in keinem Fall statistisch zu sichern (Tab.16). Die gleichsinnige Abnahme war am ehesten auf einen Verdünnungseffekt nach der Operation und den Blutentnahmen zurückzuführen. Der Hämatokrit der Medikamententiere war in dieser Zeit signifikant gefallen, während die Kontrolltiere eine signifikante Zunahme des Hämatokrits boten. Diese Befunde könnten im Sinne einer Beeinflussung durch die Testsubstanz gedeutet werden.

Die Untersuchung der Erythrozytenflexibilität ließ eine statistisch signifikante Zunahme der Erythrozyten-Verformbarkeit unter EMD 26644 erkennen.

Hiermit böte sich auch eine mögliche Erklärung für den niedrigeren Hämatokrit der Medikamententiere.

Schließlich ist für die Blutviskosität nicht zuletzt auch die Fließeigenschaft des Plasmas ausschlaggebend, die bei den Medikamententieren besonders bei niedrigen Scherraten zugenommen hatte. Hier war sehr wahrscheinlich der Einfluß des erhöhten $\eta/\dot{\gamma}$ -Bereiches in den Elektropherogrammen zu sehen. Eine Erhöhung des die Plasmaviskosität entscheidend mitbestimmenden Fibrinogens, das ebenso wie der Hämatokrit die Fließschubspannung des Blutes determiniert, war nicht gegeben. Es lag nahe, daß diese Viskositäts-erhöhung des Plasmas eine womöglich durch das Medi-

kament bedingte Viskositätserniedrigung des Vollblutes -via Hämatokrit und Erythrozytenflexibilität- teilweise wieder aufhob.

Die Bestimmung der Thrombozytenzahlen erbrachte keine richtungsweisenden Veränderungen, die durch das verabreichte Medikament verursacht wären. Es ist allerdings bekannt, daß erhöhter Thrombozytenverbrauch und herabgesetzte Thrombozytenüberlebenszeit nicht mit einer Veränderung der Thrombozytenzahlen im peripheren Blut einhergeht (20). Somit konnte durch die Bestimmung der Thrombozytenzahlen in unserem Versuch keine Aussage über den Einfluß von EMD 26644 auf die Lebensdauer oder den turn-over der Blutplättchen gemacht werden.

Nach Abschluß der Versuchsperiode waren bei der Ermittlung der "Faktoren" zur Bestimmung der "Spont aggregation" nach PAT I die Werte der Kontrolltiere im Gegensatz zu den Medikamententieren signifikant erhöht. In Untersuchungen mit überhöhten PAT-Ausgangswerten war dieser Effekt des Medikaments deutlicher (11j).

Bedeutend erschien auch die Beobachtung, daß die mit Fettfuttermisch gefütterten Medikamententiere keinen signifikanten Anstieg des PAT I zeigten, wie dies der Fall war bei Versuchstieren, denen diese cholesterinreiche Diät allein verabreicht worden war (37). Auch eine unter dieser Diät aufgetretene Erhöhung der Plasmaviskosität konnte hier nicht be-

obachtet werden (n=2), eher zeigte sich eine Tendenz zu niedrigeren Werten. Insgesamt könnte unter EMD26644 eine Schutzwirkung vor Erhöhung der Plasmaviskosität und der "spontanen Plättchenaggregation" bei erhöhten Cholesterinspiegeln bestehen.

Die angeführten Schwierigkeiten bei der Durchführung der Thrombozytenadhäsionsprüfung mittels des Faser=tests nach Jacobi (29) ließen nur begrenzte Aussagemöglichkeiten zu. Hinweise auf eine adhäsionshemmende Wirkung des Medikaments ergaben sich aus dem konstant gebliebenen Wert bei Versuchstier Nr.167 nach Fettfütterung; ebenso trat bei Tier Nr.172 etwa zwei Stunden nach Futteraufnahme nicht der erwartete Plättchenproteinstieg auf.

Ein weiterer Hinweis auf eine Wirkung des Medikaments an den Thrombozyten war die signifikante Steigerung der subaqualen Blutungszeit nach der Versuchsperiode mit Medikament. Wie aus einer anderen Untersuchung hervorgeht (1), blieben auch bei verlängerten Blutungszeiten die Thromboplastinzeit, partielle Thromboplastinzeit und Thrombinzeit unverändert. Da unter den Gerinnungstesten die Blutungszeit vorwiegend der Überprüfung der Thromozytenfunktion dient (31), konnte ein direkter Einfluß von EMD 26644 auf die Blutplättchen im vorliegenden Tierexperiment angenommen werden.

5. Zusammenfassung

Ziel der Untersuchung war die Entwicklung eines arteriellen In-vivo-Thrombosemodells und dessen Erprobung anhand einer neuen thrombozytenaggregationshemmenden Substanz (EMD 26644).

Als Thrombosemodell diente der lokale Eisreiz ("Kälteangiitis") der freigelegten a.carotis oder a.femoralis beim Hanford-Miniaturschwein. Die Gefäßpräparate wurden im Vergleich zur ungereizten Gegenseite oder vor und nach Gabe des interessierenden Medikaments rasterelektronenmikroskopisch untersucht und nach einem Bewertungsschema streng blind beurteilt.

Im vorliegenden Tierexperiment wurde EMD 26644 (Fa.Merck, Darmstadt), ein Mercaptooxacolylylcarbonsäurederivat mit hoher thrombozytenadhäsions- und aggregationshemmender Potenz, in relativ hoher Dosis an 8 Hanford-Miniaturschweine beiderlei Geschlechts oral über 10 Tage verabreicht. Dabei wurden zusätzlich verschiedene humorale und hämorheologische Parameter geprüft.

Unter Behandlung mit EMD 26644 kam es häufig zu Futterabneigung und postoperativen Wundheilungsstörungen. Ein Einfluß des Medikaments auf Leber- und Nierenfunktion, Elektrolyte, Blutzucker, Cholesterin und Triglyceride, Hämoglobin, Erythrozyten, Fibrinogen und Thrombozytenzahlen war nicht zu erkennen. Harnstoff-N im Serum stieg unter Behandlung an.

Die behandelten Tiere zeigten einen signifikanten Hämatokritabfall. Die spontane Plättchenaggregationsneigung stieg bei den behandelten Tieren nicht, bei den unbehandelten Tieren signifikant an. Die subaquale Blutungszeit erhöhte sich bei den Medikamententieren signifikant.

Die streng blind ausgewerteten rasterelektronenmikroskopischen Bilder nach lokalem Eisreiz ergaben eine signifikante Hemmung der Adhärenz von Thrombozyten durch das Medikament in vivo. Dadurch konnte die gute Reproduzierbarkeit und die Funktionstüchtigkeit dieses arteriellen In-vivo-Thrombosemodells (lokaler Eisreiz) am Miniaturschwein belegt werden.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Bethge, H.: EMD 26644, Review of the results of the clinical trials. Vortrag anlässlich des Auslandsmedizinertreffens, Dez.1977
- 2 Bosek, S.: Rasterelektronenmikroskopie heute. Bio=technische Umschau 12, 46 (1978)
- 3 Breddin, K.: Die Acetylsalicylsäure in der Prophylaxe und Therapie thromboembolischer Erkrankungen. Med.Welt, 35, 447 (1975)
- 4 Breddin, K., Bauke, J.: Thrombozytenagglutination und Gefäßkrankheiten. Blut 11, 144 (1965)
- 5 Campbell, R.C.: Statistische Methoden für Biologie und Medizin. G.Thieme-Verlag, Stuttgart 1971
- 6 Dahme, E.: Das Schwein, ein Versuchstier für die experimentelle Arterioskleroseforschung. Z.ges. exp.Med. 145, 305 (1968)
- 7 Detzer, St., Stampel, B., Wetzstein, R.: Gestaltwandel der Thrombozyten im experimentellen Thrombus. Verh.anat.Ges. 60, 221 (1965)
- 8 Dintenfass, L.: Considerations of the viscosity of red cells and its effect on the viscosity of the whole blood. Angiology 13, 333 (1962)
- 9 Dintenfass, L.: Fluidity of the erythrocyte and its role in physiology and pathology of circulation. Haematologia 2, 19 (1968)
- 10 Douglas, W.R.: Of pigs and menin research: a review of applications and analogies of the pig, sus scrofa, in human medical research. Space Live Sci. 3, 226 (1972)
- 11 EMD 26644 - nicht publizierte interne Forschungsberichte als ZPD (=Zentrale Präparate Dokumentation) der Fa. E. Merck, Darmstadt:
 - a Diekmann, H., Faro, H.P.: Metabolitenmuster in den Ausscheidungsprodukten von Ratte, Beagle-Hund, Rhesusaffe und Mensch nach oraler Applikation. ZPD 20
 - b Diekmann, H., Faro, H.P.: Metabolitenmuster im Serum sowie in den Ausscheidungsprodukten von Ratte und Beagle-Hund nach i.v.-Applikation. ZPD 26
 - c Froberg, H.: Prüfung auf akute Toxizität für Mäuse und Ratten nach oraler Applikation. ZPD 3

- d Froberg, H., Engermann, J.: Prüfung auf akute Toxizität für Mäuse, Ratten, Kaninchen und Hunde nach oraler Applikation sowie für Mäuse und Ratten nach intraperitonäaler Injektion. ZPD 12
 - e Froberg, H.: Zusammenfassung der toxikologischen Untersuchungen. ZPD 120
 - f Garbe, A., Diekmann, H., Nowak, H.: Quantitative Bestimmungen im Blutserum und anderen biologischen Proben durch Gaschromatographie. ZPD 23
 - g Garbe, A., Nowak, H.: Pharmakokinetik-Untersuchungen an Ratten und Rhesusaffen. ZPD 19
 - h Leopold, G.: Untersuchungen der Langzeitverträglichkeit von EMD 26644 an gesunden männlichen Probanden. ZPD 34
 - i Leopold, G., Diekmann, H.: Humanpharmakokinetik-Untersuchungen auf Dosisabhängigkeit der Kinetik. ZPD 38
 - j Leopold, G., Nowak, H., Ungethüm, W.: Humanpharmakologie-Untersuchungen zur Beeinflussung der Thrombozytenaggregation und -adhäsion nach einmaliger oraler Gabe von 250 mg EMD 26644. ZPD C
 - k Lettenbauer, H.: Prüfung eines Einflusses auf die Elektrolyt- und Urinausscheidung, die Futter- und Wasseraufnahme und das Körpergewicht bei Ratten. ZPD 21
 - l Lissner, R., Maisenbacher, J.: EMD 26644-tierexperimentelle Untersuchungen zur Beeinflussung der Thrombozytenfunktion, Gerinnung und Fibrinolyse. ZPD A
 - m Steiner, K.: Untersuchungen an Wistar-Ratten, Beagle-Hunden und Rhesusaffen nach i.v.-Applikation. ZPD 40
 - n Wild, A.: EMD 26644 - Antirheumatikum. ZPD 35
- 12 Frost, H.: Study of the pathogenesis of obliterating arterial diseases by means of a raster electron microscope technique. In G.Schettler: Platelets and the Vessel Wall-Fibrin Deposition. G.Thieme-Verlag, Stuttgart 1969
 - 13 Frost, H.: Endothelschädigungen und Abscheidungen von Elementen des strömenden Blutes als initiales Geschehen in der Pathogenese der Arteriosklerose. Verhandl. der Deutschen Gesllsch. für innere Medizin, 78.Band, J.F.Bergmann, München 1972
 - 14 Frost, H.: Die verschließende Koronarthrombose im rasterelektronenmikroskopischen Bild. In R.Marx und H.A.Thies: Herzinfarkt und Blutgerinnung, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York 1972
 - 15 Frost, H.: Arterielle Verschlusskrankheiten. Kurzmonographien Sandoz, Nr.10

- 16 Frost, H., Hess, H., Richter, I.: Untersuchungen zur Pathogenese arterieller Verschlusskrankheiten. Klin. Wschr. 20, 58 (1968)
- 17 Geissinger, H.D., Mustard, J.F., Rowsell, H.C.: The occurrence of microthrombi on the aortic endothelium of swine. Cand.med Ass.J. 87, 405 (1962)
- 18 Gottlob, R., Zinner, G.: Über die Regeneration geschädigter Endothelien nach hartem und weichem Trauma. Virchows Arch.path.Anat. 336, 16 (1962)
- 19 Grigoleit, H.G.: ATP-Gehalt der Erythrozyten als Maß für ihre Verformbarkeit. Pharmatherapeutica 1, 241 (1976)
- 20 Harker, L.A.: Control of platelet production. Annu. Rev.Med. 25, 383 (1974)
- 21 Harker, L.A., Wall, R.T., Haslam, J.M.: Sulfipyrazone prevention of homocysteine induced endothelial cell injury and arteriosclerosis. Clin.Res. 23, 3 (1978)
- 22 Hatschek, E.: Die Viskosität von Blutkörperchensuspensionen. Kolloid.Z. 4, 163 (1920)
- 23 Hess, H.: Neue Überlegungen zur Pathogenese obliterierender Angiopathien. Fortschr.d.Med. 20, 21 (1970)
- 24 Hess, H.: Zur Pathogenese der arteriellen Durchblutungsstörungen. dmj 2, 340 (1972)
- 25 Hess, H., Keil-Kuri, E.: Theoretische Grundlagen der Prophylaxe obliterierender Angiopathien mit Aggregationshemmern und Ergebnisse einer Langzeitstudie mit ASS. Colfarit-Symposium III, Köln, Okt.1975
- 26 Hess, H., Marshall, M., Mallasch, M.: Eine einheitliche Theorie der Morphogenese aller obliterierender Angiopathien. VASA 3, 373 (1974)
- 27 Hladovec, J.: Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions. Physiol.Bohemoslov 72, 24 (1978)
- 28 Jacobi, E., Leopold, G.: Human-pharmacological investigations on the platelet adhesiveness- and aggregationinhibiting effect of EMD 26644. Int.J.clin. Pharmacol. 16, 136 (1978)

- 29 Jacobi, E., Hagemann, H.: Eine In-vitro-Methode zur Bestimmung der Thrombozytenadhäsivität. Thrombos. Diathes.Haemorrh. 26, 192 (1971)
- 30 Jørgensen, L., Packham, M.A.: Deposition of formed elements of blood on the intima and signs of intimal injury in the aorta of rabbit, pig and man. Lab. Invest. 27, 341 (1972)
- 31 Kaboth, W., Begemann, H.: Untersuchungen zur Bestimmung der Blutungs- und Gerinnungszeit. In: Gauer-Kramer-Jung, Physiologie des Menschen, Band 5 (Blut), Urban und Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1971
- 32 Kuschinsky, G.: Taschenbuch der modernen Arzneibehandlung. G.Thieme Verlag, 7.Aufl., 241 ff, Stuttg.75
- 33 Löffler, K.: Anatomie und Physiologie der Haustiere. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart 1976
- 34 Lydtin, H., Pieper, M., Kusus, T., Schnelle, K., Zöllner, N.: Die Implantation von Verweilkathetern in die vena portae, vena cava, den rechten Vorhof und in den Magen des Miniaturschweines. Z.ges.exp. Med. 149, 279 (1969)
- 35 Marshall, M.: Tiermodelle zur Atheroskleroseforschung VASA 7, 313 (1978)
- 36 Marshall, M.: Atherogenese. Experimentelle Untersuchungen zur Pathogenese obliterierender Angiopathien beim Miniaturschwein. Münch.med.Wschr. 121, 1211 (1979)
- 37 Marshall, M., Frank, J., Halsner, R., Hess, H.: Diätetisch induzierte Hypercholesterinämie beim Miniaturschwein als Angiopathiemodell. Verhandl.d. Deutsch.Gesellsch. für innere Medizin 85.Band, 881 J.F.Bergmann Verlag, München 1979
- 38 Marshall, M., Hess, H.: New findings concerning pathogenesis and non-surgical treatment of peripheral arterial diseases. VASA 7, 49 (1978)
- 39 Marshall, M., Lisson, G.: Untersuchungen zur Frage der Abdichtung von Kunststoffgefäßprothesen. VASA 5, 122 (1976)

- 40 Marshall, M., Lydtin, H., Krawietz, W., Hagen, R., Schuckert, G., Zöllner, N.: Das Miniaturschwein als Versuchstier in der experimentellen Medizin. Res. exp.Med. 157, 300 (1972)
- 41 Marshall, M., Lydtin, H., Schuckert, G., Lohmöller, R., Zöllner, N.: Erfahrungen mit einer neuen Anästhesie am Miniaturschwein. Zbl.Vet.Med. 19, 241 (1972)
- 42 Marshall, M., De Quiros, J., Hess, H.: Wirkung von Nikotin auf Plättchenaggregation und Blutviskosität. VASA 5, 287 (1976)
- 43 Melzer, G., Lissner, R., Maisenbacher, H.J.: Über die thrombozytenaggregationshemmende Wirksamkeit von EMD 26644 im Tiermodell. Vortragstagung der Fachgruppe "Medizinische Chemie" der Gesellschaft Deutsch. Chemiker, Freiburg/Br., Mai 1978
- 44 Mustard, J.F.: Platelets, thrombosis and vascular diseases. Canad.med.J. 85, 621 (1961)
- 45 Reumuth, H.: "Stereoscan", ein neues Elektronenmikroskop. Erste anatomische Bilder. Zugleich ein Beitrag zur Blut-Gefäßwand-Beziehung. Klin.Wschr. 46, 1276 (1968)
- 46 Ross, R., Glomset, J.A.: The pathogenesis of atherosclerosis. New Engl.J.Med. 295, 420 (1976)
- 47 Schildberg, F.W., Zumbob, V.: Aktuelle Gesichtspunkte zur postoperativen Infusionstherapie. Chirurg 47, 164 (1976)
- 48 Sinapius, D.: Defektregeneration des Venenendothels nach experimenteller Quetschung. Virchows Arch.path. Anat. 341, 291 (1966)
- 49 Schmid-Schönbein, H., Gallasch, G.: Microrheology and protein chemistry of pathological red cell aggregation, studied in vitro. Biorheology 10, 213 (1973)
- 50 Schulz, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Frage der Fettphagozytose und des Fetttransportes durch Thrombozyten. Klin.Wschr. 40, 1114 (1962)
- 51 Sunder-Plassmann, L.: Blutviskosität und Hämodynamik bei Anwendung kolloidaler Volumenersatzmittel. Anaesthesist 20, 172 (1971)

- 52 The Anturano Trial Research Group: Sulfipyrazone in the prevention of cardiac death after myocardial infarktion. New Engl.J.Med. 298, 299 (1978)
- 53 Wells, R.E., Merill, E.W.: Influence of flow properties of blood upon viscosity - haematokrit relationship. J.of clinical Investigation 41, 1591 (1962)

Herrn Priv.Doiz.Dr.med.Marshall danke ich für die Überlassung des Themas und seine unermüdliche Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch Helmut Oberhofer, Irmgard Pfaffinger, Ruth Reiser, Hans Taller, Frau Queisner und Herrn Aouini für ihre ständige Mithilfe bei den Operationen, den Untersuchungen im Labor, der Arbeit am Rasterelektronenmikroskop und bei der Tierhaltung.

Mit dieser Arbeit will ich mir auch ein ehrendes Andenken an meinen lieben Kollegen Josef Frank bewahren, der am 15.07.1978 am Wilden Kaiser abstürzte.

7. Lebenslauf

18.04.1949 geboren in Augsburg, als erstes Kind von Anton Wagner, Polizeibeamter, und seiner Ehefrau Anneliese Wagner

Sept. 1955 Volksschule Obergriesbach, Lkr. Aichach-Friedberg

- Juli 1960

Sept. 1960 Hum. Gymnasium, zunächst 4 Klassen im Internat Reimlingen, Lkr. Donau-Ries, dann bis zum Abitur im Mai 1969 Theodor-Heuss-Gymnasium Nördlingen

- Juni 1969

Juli 1969 Bundeswehrzeit

- Juni 1971

Nov. 1971 Studium der Humanmedizin an der LMU München

- Okt. 1977

Herbst 1972 : Vorphysikum

Herbst 1973 : Physikum

Herbst 1974 : 1. Teil d. ärztl. Prüfung

Herbst 1976 : 2. Teil d. ärztl. Prüfung

Herbst 1976

- Herbst 1977: Praktisches Jahr (Innere Medizin, Chirurgie, Gynäkologie)

Herbst 1977 : 3. Teil d. ärztl. Prüfung

25.10.1977 Approbation als Arzt

ab Jan. 1978 Ass.-Arzt am Städt. Krankenhaus Penzberg (1 Jahr Chirurgie, anschließend Innere Medizin)

---.---.---.---.---.---.---.---.---.

23.09.1975 Verehelichung mit der Pädagogikstudentin Lydia Erdlen

12.11.1979 Geburt unseres Sohnes Philipp

